

MARIA CRISTINA DA SILVA CORTINHAS

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Atherinella brasiliensis*
(TELEOSTEI, ATHERINIFORMES, ATHERINOPSIDAE) BASEADA EM
MARCADORES RAPD DAS LOCALIDADES DE PONTAL DO SUL E
LARANJEIRAS (PR), LAGOA DA CONCEIÇÃO E LAGOA DO CAMACHO (SC),
LAGOA DOS PATOS (RS), LAGOA DE CARAPEBUS (RJ) E BARRA GRANDE
DE CAMAMU (BA)**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Genética,
Programa de Pós-Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Margarete
Cestari**

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli



**CURITIBA
2007**

Dedico esta tese ao meu marido e filhos, pelo amor e apoio e à minha mãe, grande amiga e incentivadora

“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina” (CORA CORALINA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese, em especial:

Ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná pelo apoio, condições e oportunidades oferecidas tornando possível a realização do meu doutorado.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio concedido.

À Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, minha orientadora, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, dicas e apoio, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto José Prioli, da Universidade Estadual de Maringá, meu co-orientador, pelos ensinamentos, pelo acompanhamento e críticas sempre tão pertinentes.

À Prof^a Dr.^a Sonia Maria A. P. Prioli, da Universidade Estadual de Maringá, por oportunizar, de maneira tão agradável, os primeiros ensinamentos a respeito da técnica desenvolvida no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Ives Sbalqueiro, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni e à Prof^a Dr.^a Chirlei Glienke, em especial, membros da comissão de acompanhamento do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, pelas sugestões e críticas durante o desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a Dr.^a Jaisa Fernandes Soares responsável pelo Laboratório de Química Bioinorgânica do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento do oxigênio para as extrações do DNA sempre de uma maneira tão gentil e atenciosa.

À Prof^a Dr.^a Marlise Bemvenuti da Universidade Federal de Rio Grande (RS), pela coleta dos exemplares de *Atherinella brasiliensis* da Lagoa dos Patos (RS).

Ao mestre Victor Trivério da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela coleta dos exemplares de *Atherinella brasiliensis* da Lagoa de Carapebus (RJ).

Ao Dr. Cláudio Sampaio (Buia) pesquisador associado ao Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia, pela coleta dos exemplares de Barra Grande de Camamu (BA).

A todos os professores do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná pelos ensinamentos ministrados.

A todos os colegas do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná pela alegre convivência que me proporcionaram durante estes quatro anos de doutorado em especial a Raiana pelo auxílio na fase final do estudo, e a Thais e Taynah pelo apoio, carinho e pelas risadas gostosas.

Ao Marcos e ao Rafael do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná, pelas palavras de apoio, pelas sugestões e críticas e por ouvir meus lamentos sem reclamar (pelo menos para mim).

À Wanessa, do Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná, de uma forma muito especial, pela ajuda inestimável e fundamental nesta etapa final do trabalho.

A todos os colegas do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná pelo agradável convívio durante estes quatro anos de doutorado.

Ao meu marido Luciano, por estar presente em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, amor, carinho e por entender a minha ausência tão freqüente nesta fase final do trabalho.

Ao meu filho Juliano pelo amor, paciência e compreensão durante os momentos de stress e à Silvana pelas palavras de carinho nas horas de aflição.

Ao meu filho Renato, pelo amor e carinho e à Guta pelo apoio e ajuda na montagem do Dendrograma.

À minha filha Mariana, a preferida, pelo amor, compreensão, companheirismo e pela ajuda durante as traduções.

Aos meus pais pelo amor a mim dedicado e a minha mãe, minha grande amiga, pelas palavras de apoio sempre constantes.

A Deus, pela minha vida, saúde, fé e força e a Nossa Senhora, pela proteção e orientação em todos os momentos.

Enfim, a todos que me cercam, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	1
1.2 TÉCNICA DE RAPD, VARIAÇÕES E APLICAÇÕES	5
1.3 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA RAPD NO GENOMA DOS PEIXES.....	12
2 OBJETIVO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAL	23
3.2 MÉTODOS	30
3.2.1 Das coletas.....	30
3.2.2 Extração de DNA Genômico	36
3.2.3 Amplificação das Bandas de RAPD	38
3.2.4 Análise Eletroforética de RAPD.....	43
3.2.5 Análises Estatísticas.....	44
4 RESULTADOS.....	46
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICES	x

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENÇAS ENTRE RAPD, AP-PCR E DAF	8
TABELA 2 - TAMANHO APROXIMADO (PB) DOS FRAGMENTOS DE DNA GERADOS A PARTIR DA REAÇÃO DE RAPD EM <i>Odontesthes argentinensis</i> E <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES A PARTIR DE 12 INICIADORES	48
TABELA 3 - FREQUÊNCIA DE ALGUMAS BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS GERADAS A PARTIR DA AMPLIFICAÇÃO COM OS 12 INICIADORES UTILIZADOS NESTE TRABALHO	64
TABELA 4 - TESTE DE MANTEL (1967) OBTIDO ATRAVÉS DE 10.000 PERMUTAÇÕES ALEATÓRIAS.....	70
TABELA 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES (AMOVA – EXCOFFIER, 1992).....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE <i>Atherinella brasiliensis</i>	23
FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO COMPLEXO ESTUARINO BAÍA DE PARANAGUÁ (PR)	24
FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DA CONCEIÇÃO (SC).....	25
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DO CAMACHO (SC).....	26
FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DOS PATOS (RS)	27
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DE CARAPEBUS (RJ).....	28
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA BARRA GRANDE DE CAMAMU (BA)	29
FIGURA 8 - LOCAIS DE COLETA DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DO COMPLEXO ESTUARINO DA BAÍA DE PARANAGUÁ (PR)	31
FIGURA 9 - LOCAL DE COLETA DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DA LAGOA DOS PATOS (RS).....	32
FIGURA 10 - LOCAL DE COLETA DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DA LAGOA DE CARAPEBUS (RJ).....	33
FIGURA 11 - LOCAL DE COLETA DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DA LAGOA DA CONCEIÇÃO (SC).....	34
FIGURA 12 - LOCAL DE COLETA DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DA LAGOA DO CAMACHO (SC).....	35
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD EM GEL DE AGAROSE 1,4% EM EXEMPLARES DE <i>Atherinella brasiliensis</i> PARA TESTE DOS INICIADORES.....	41
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS E <i>Odontesthes argentinensis</i> (GRUPO EXTERNO) OBTIDO ATRAVÉS DO INICIADOR OPX07.....	49
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW03.....	54

FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW04.....	55
FIGURA 17 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW06.....	56
FIGURA 18 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW09.....	57
FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPX17.....	58
FIGURA 20 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPE09.....	59
FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E <i>Odontesthes argentinensis</i> OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPK14.....	60
FIGURA 22 - GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA AS ESPÉCIES <i>Atherinella brasiliensis</i> DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS E <i>Odontesthes argentinensis</i> (GRUPO EXTERNO).....	67
FIGURA 23 - GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA A ESPÉCIE <i>Atherinella brasiliensis</i> DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS.....	68
FIGURA 24 - GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA A ESPÉCIE <i>Atherinella brasiliensis</i> DAS LOCALIDADES DE PONTAL DO SUL E LARANJEIRAS (PR), LAGOA DA CONCEIÇÃO E LAGOA DO CAMACHO (SC), LAGOA DOS PATOS (RS) E LAGOA DE CARAPEBUS (RJ).....	69

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES	94
APÊNDICE 2 - DENDROGRAMA	103
APÊNDICE 3 - GRÁFICOS DE COORDENADAS PRINCIPAIS TRIDIMENSIONAIS	107

RESUMO

A espécie *Atherinella brasiliensis* pertence à ordem Atheriniformes cujos peixes são conhecidos popularmente como *silversides* ou peixes-rei e à família Atherinopsidae. Possuem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em ambientes estuarinos ou de água salobra, porém, com maior frequência em águas costeiras, sendo considerado um peixe residente destes locais. Apesar de seu pequeno porte (10 a 16 cm), ocorre em abundância durante todo o ano, o que a torna utilizada pelos pescadores como fonte complementar de renda ou mesmo alimentar. Devido a variações cromossômicas encontradas em estudo recente em exemplares das localidades de Pontal do Sul (PR) e Lagoa da Conceição (SC), o marcador de RAPD foi utilizado no presente trabalho a fim de detectar a variabilidade genética em exemplares das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR), Lagoa da Conceição e Lagoa do Camacho (SC), Lagoa dos Patos (RS), Lagoa de Carapebus (RJ) e Barra Grande de Camamu (BA). Dos 24 iniciadores testados foram escolhidos 12 com base na repetibilidade, padrão nítido de bandas e presença de bandas polimórficas (OPW03, OPW04, OPW06, OPW09, OPW17, OPX04, OPX07, OPX17, OPX20, OPA06, OPE09 e OPK14). Com o objetivo de avaliar a diferenciação genética e estruturação populacional dos exemplares das sete diferentes localidades acima citadas foram utilizados os programas NTSYS 2.1, ARLEQUIN versão 2000 e MANTEL STRUCT 1.0. Um grupo externo foi usado (*Odontesthes argentinensis*) para avaliar se os exemplares das diferentes regiões pertenciam à mesma espécie. A partir dos resultados obtidos sugere-se a existência de quatro diferentes populações. A População 1 seria formada pelos exemplares das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC). Como a espécie *A. brasiliensis* não realiza migração horizontal e devido ao fato dos indivíduos da Lagoa da Conceição (SC) se encontrarem isolados dos demais, sugere-se que: o tempo de isolamento talvez não tenha sido suficiente para promover uma possível diferenciação genética, ou, os efeitos da fragmentação sobre a estruturação da diversidade genética podem ainda ser pequenos e não totalmente detectáveis pela técnica de RAPD. A População 2 seria formada pelos exemplares da Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa dos Patos (RS). Como os peixes-rei destas duas localidades se encontram também isolados e não migram para o mar aberto, sugere-se que a homogeneidade encontrada se deva aos mesmos fatores citados para a População 1. A População 3 seria formada pelos indivíduos da Lagoa de Carapebus (RJ) e a População 4 pelos de Barra Grande de Camamu (BA). Além de a distância geográfica ser maior entre os exemplares destas localidades e as demais dificultando o fluxo gênico, as diferenças ambientais têm sido indicadas como um importante fator responsável pela diferenciação genética, visto que em alguns casos, indivíduos de localidades mais próximas apresentaram diferenciação genética maior do que aqueles mais distantes. Devido à alta diferenciação genética encontrada entre os indivíduos da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) em relação às demais regiões estudadas sugere-se estar ocorrendo um processo de especiação. Para fins de manejo e conservação da diversidade genética cada uma destas populações poderia ser tratada como uma unidade reprodutiva independente.

ABSTRACT

The species *Atherinella brasiliensis* belongs to the order Atheriniformes, whose fishes are known as silversides, and to the family Atherinopsidae. They have a broad geographical distribution, which occurs in estuarine or brackish water environments, though they are more frequently found in coastal waters, being considered a resident fish of such locations. Despite its small size (10 to 16 cm), the *Atherinella brasiliensis* is found in abundance all year long, becoming a complementary income and an alternative food source. Due to the chromosome variations found in recent studies with samples from Pontal do Sul (PR) and Lagoa da Conceição (SC), the RAPD marker was used in the present study in order to detect the genetic variability in samples from Pontal do Sul and Laranjeiras (SC), Lagoa da Conceição and Lagoa do Camacho (SC), Lagoa dos Patos (RS), Lagoa de Carapebus (RJ) and Barra Grande de Camamu (BA). Out of the 24 primers tested, 12 were chosen based on the repetitive performance, clear band pattern and presence of polymorphic bands (OPW03, OPW04, OPW06, OPW09, OPW17, OPX04, OPX07, OPX17, OPX20, OPA06, OPE09 e OPK14). Aiming to evaluate the genetic differentiation and population structure of the samples of the seven places mentioned above, the programs NTSYS 2.1, ARLEQUIN version 2000 and MANTEL STRUCT 1.0 were used. An external group was used (*Odontesthes argentinensis*) to evaluate whether the samples from the different regions belong to the same species. The results suggest the existence of four distinct populations genetically. Population 1 would be formed by the samples from Pontal do Sul and Laranjeiras (PR) and Lagoa da Conceição (SC). Since the *A. brasiliensis* species does not have horizontal migration and due to the fact that the individuals from Lagoa da Conceição (SC) are isolated from the others it is suggested that: the time of isolation may not be enough to promote a possible genetic differentiation, or, the fragmentation effects over the genetic diversity structure might still be small and not detectable by the RAPD technique yet. Population 2 would be formed by the samples from Lagoa do Camacho (SC) and Lagoa dos Patos (RS). Since the silversides from these two locations are also isolated and do not migrate to open sea, it is suggested that the homogeneity found is due to the same factors as in cited Population 1. Population 3 would be formed by the samples of individuals from Lagoa de Carapebus (RJ) and Population 4 from Barra Grande de Camamu (BA). Besides the larger geographic distance between these two population samples, in comparison to the others studied, which makes it difficult to have a gene flow, the environmental differences have been pointed out as an important factor, responsible for the genetic differentiation, since, in some cases, individuals from closer locations have more differences than those more distant. Due to the high genetic differentiation found among the individuals from Barra Grande de Camamu (BA) in relation to the other studied regions, it is suggested that a speciation process is occurring. In order to handle and preserve the genetic diversity, each one of these population should be treated as an independent reproductive unity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A ordem Atheriniformes é um grupo monofilético irmão da superordem Cyprinodontea, um clado composto pelos Cyprinodontiformes e Beloniformes sendo que esta reunião compõe parte da série Atherinomorpha. Os peixes desta ordem são conhecidos como *silversides* ou peixes-rei sendo compostos por seis famílias, dentre elas a Atherinopsidae, e 49 gêneros (DYER, 2006). Encontram-se distribuídos em águas marinhas, doces e estuarinas e em ambientes tropicais e temperados ao redor do mundo (BEHEREGARAY; SUNNUCKS, 2001).

No Brasil, os peixes-rei da família Atherinopsidae estão representados por espécies marinhas, estuarinas e de água doce sendo compostos por dois gêneros: *Odontesthes* e *Atherinella* (LUCENA, 2001). Dentro do gênero *Atherinella*, destaca-se por sua elevada abundância o peixe-rei *Atherinella brasiliensis*, que pertence à subfamília Menidiinae e tribo Membradini. Esta espécie ocorre na América do Sul, desde a Venezuela até o Rio Grande do Sul aparecendo com maior frequência em águas costeiras, principalmente na desembocadura de rios, e nas regiões de água salobra (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978), sendo considerada uma espécie estuarina residente nestes ambientes (PESSANHA; ARAÚJO, 2001).

Na costa brasileira a espécie *Atherinella brasiliensis* se mostrou abundante e/ou constante na região estuarina do estado de Pernambuco (FRANÇA, 2005), na Baía de Todos os Santos (BA) (SANTOS et al., 1999) e no estado do Rio de Janeiro como mostrado pelos trabalhos realizados por BARBIERI et al. (1990) na Laguna do Marapendi, ANDREATA et al. (1992, 1997) na Laguna de Jacarepaguá e Lagoa Rodrigo de Freitas respectivamente e PESSANHA et al. (2000) na Baía de Sepetiba. Resultados semelhantes foram obtidos por PAIVA FILHO e GIANINNI (1990) no complexo Baía-Estuarino de Santos e São Vicente (SP), por VENDEL et al. (2000) e FAVARO, LOPES e SPACH (2003) no Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (PR), por HOSTIM-SILVA et al. (1995) na Lagoa da Conceição (SC), e por BEMVENUTI (1987) na região estuarina da Lagoa dos Patos (RS).

A *Atherinella brasiliensis* não realiza migrações horizontais, o que poderia ser compensado por uma migração “vertical”. Em determinadas épocas do ano pode haver preferência por águas profundas para se alimentar e iniciar a maturação das

gônadas e, em outra época, águas rasas para desovar. Provavelmente os maiores exemplares ocupam pontos de maior profundidade, procurando esporadicamente as regiões marginais para alimentação ou reprodução sendo que os exemplares menores procuram manter-se em águas rasas, pois desta forma têm mais chances de não serem predados. Águas mais profundas, principalmente no inverno, podem significar maior proteção a variações de temperatura, maior riqueza de alimento e menor ação de turbulências provocadas pelos ventos constantes nesta época. Portanto, exemplares de diferentes comprimentos ocupam nichos ecológicos diferentes, sendo isso de grande importância ecológica na regulação bioenergética da população (HOSTIM-SILVA et al., 1995).

Embora não seja eficientemente capturada na pesca artesanal, em virtude da seletividade do aparelho de pesca utilizado, a *Atherinella brasiliensis* é uma das espécies mais abundantes em arrastos de praia costeiros e estuarinos no litoral sudeste-sul do Brasil (PAIVA-FILHO et al., 1987) sendo por isso bastante utilizados como fonte complementar de renda ou mesmo fonte alimentar (HOSTIM-SILVA et al., 1995). Apresenta como característica ser um peixe estuarino dependente e para que se possa entender a respeito de sua estruturação populacional, é de fundamental importância que se conheça um pouco a respeito do ambiente onde esta espécie vive.

Os estuários constituem ecossistemas vitais para muitas espécies de peixes desempenhando papel importante para sua reprodução, crescimento, alimentação e migração. Sob o ponto de vista ecológico é um ecótono, ou seja, uma região de transição entre o mar e a água doce (VIEIRA; GARCIA, 2007). A definição mais amplamente utilizada é a de PRITCHARD (1967) segundo a qual um estuário é um corpo de água semifechado que apresenta uma conexão livre com o oceano na qual a água do mar é diluída pela água doce derivada da drenagem terrestre. Os principais fatores que caracterizam os estuários e que são de fundamental importância para os seres vivos que habitam este local são: luz, profundidade, temperatura, zoogeografia, chuva, turbidez, maré e salinidade (VIEIRA; GARCIA, 2007). A variação em qualquer um destes fatores interferirá nos demais desestabilizando o ecossistema como um todo.

No Brasil, poucos estudos existem na área molecular ou citogenética para peixes da família Atherinopsidae. Até o momento foi analisado citogeneticamente da

costa brasileira o peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (DA SILVA CORTINHAS et al., 2003). Os autores avaliaram duas populações da Baía de Paranaguá (PR) e uma da Lagoa da Conceição (SC) as quais apresentaram um $2n=48$ cromossomos com um cariótipo padrão (encontrado na maior parte dos indivíduos) constituído por: $4M +, 10SM + 14ST + 20A$ ($NF=76$). Foram encontrados cinco diferentes citótipos na população da Baía de Paranaguá (PR) enquanto nos da Lagoa da Conceição (SC) apenas um. Este fato pode ser devido ao menor número de exemplares analisados nesta última população. O maior número de citótipos encontrados nos exemplares da Baía de Paranaguá (PR), em relação ao encontrado na Lagoa da Conceição (SC), poderia ser também devido ao efeito de poluentes por derivados de petróleo, outros contaminantes ou estar refletindo um processo de evolução biológica.

Para BAMBER e HENDERSON (1988) é aparente que os aterinídeos apresentam um alto grau de plasticidade, o qual é inerente dentro do seu conteúdo genético e propõe um modelo geral de especiação de *silversides* baseados nas observações de sua biologia reprodutiva, variabilidade morfológica e nas especulações a respeito de seus padrões evolucionários. Este modelo prevê que ambientes semi-isolados e fisicamente variados tais como os estuarinos e lagoas costeiras (de água salobra) atuam selecionando genótipos generalistas que podem ajustar sua morfologia, fisiologia e comportamento para uma série de variadas condições. Esta seletiva plasticidade poderia pré-adaptar populações de *silversides* estuarinos a invadir, colonizar e radiar para nichos ecológicos diferentes.

Muitos estudos têm observado que em espécies marinhas a diferenciação genética intraespecífica é tipicamente reduzida quando comparada a organismos de água doce e que isto se deve a ausência de grandes barreiras para a dispersão e ao grande tamanho das populações. Porém, devido ao aumento de estudos utilizando marcadores moleculares, mesmo espécies oceânicas reconhecidas pela capacidade migratória e de dispersão, têm revelado a presença de estoques diferenciados indicando que o fluxo gênico pode ser restrito, ao contrário da visão tradicional sobre a composição populacional dos animais deste ambiente (GOMES; DALES; OXENFORD, 1998).

Estruturação genética e especiação incipiente foram observadas em populações do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* que vivem em ambientes estuarino (Lagoa dos Patos e Lagoa Custódia-Brasil e Lagoa Rocha-Uruguai) e

marinho (Praia do Cassino – Brasil) onde variações genéticas levaram a mudanças de hábitat com posterior isolamento reprodutivo (BEHEREGARAY; SUNNUCKS, 2001).

Em estudo realizado por BEHEREGARAY, SUNNUCKS e BRISCOE (2002) no peixe-rei *Odontesthes perugiae* de sete lagoas e um rio no Sul do Brasil, devido a eventos vicariantes que promoveram o isolamento geográfico das populações, os autores sugeriram a ocorrência de especiação devido ao isolamento reprodutivo.

O genoma dos peixes parece sofrer mudanças mais rapidamente do que o de outros vertebrados sugerindo assim que o dos peixes é “plástico” se comparado com o genoma de outros vertebrados (VENKATESH, 2003).

Devido à espécie *Atherinella brasiliensis* ser um aterinídeo que habita ambientes estuarinos (propícios a mudanças), apresentar uma plasticidade genética que condiciona a invasão de novos habitats, formar populações isoladas, e ter apresentado polimorfismo cromossômico (DA SILVA CORTINHAS et al., 2003), o objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética em exemplares de sete diferentes localidades: Baía de Barra Grande de Camamu – Maraú (BA), Lagoa de Carapebus – Macaé (RJ), Baía de Laranjeiras e Pontal do Sul pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (PR), Lagoa da Conceição – Florianópolis (SC), Lagoa do Camacho - Laguna (SC) e Lagoa dos Patos – Rio Grande (RS).

1.2 TÉCNICA DE RAPD, VARIAÇÕES E APLICAÇÕES

Até o início dos anos 70 o DNA era uma molécula de difícil estudo bioquímico mas, atualmente, graças ao desenvolvimento das tecnologias de manipulação que permitiram a investigação genômica, o DNA é uma das moléculas mais fáceis de ser estudada. A possibilidade de quantificar a variabilidade genética pela análise direta de polimorfismos de fragmentos e até de seqüências de nucleotídeos tem repercutido intensamente e impulsionado a genética de populações e a genética do processo evolutivo.

Freqüentemente, as técnicas da biologia molecular podem ser empregadas como ferramentas para a obtenção de informações no campo da ecologia. De um modo geral, são utilizados marcadores moleculares para acessar o genoma de uma ou mais espécies, quantificar a variabilidade e determinar a estrutura genética das populações. Esta é uma abordagem recente que tem se mostrado eficiente em inferências e respostas para importantes questões ecológicas (PRIOLI et al., 2000).

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA e têm sido consideradas ferramentas importantes e fundamentais em estudos relacionados com a estrutura de populações de peixes. Os resultados obtidos através da análise são úteis na detecção de variação e fornecem informações seguras sobre os níveis de variabilidade e similaridade entre distintas populações ou estoques (MARTINS et al., 2002).

Os tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente diferenciam-se pelo método utilizado para revelar polimorfismo de DNA, variando assim quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso e repetibilidade de resultados (LOPES et al., 2002).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Entre os marcadores moleculares revelados por amplificação encontram-se aqueles que utilizam um único iniciador como o RAPD e o ISSR. No RAPD é utilizado um iniciador curto (10 a 11 bases) de seqüência nucleotídica aleatória enquanto no ISSR o iniciador é mais longo (16 a 25 bases) e possui a seqüência repetitiva de um microssatélite.

Os marcadores moleculares podem ter característica dominante ou co-dominante. Quando é possível distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos, o marcador é dito co-dominante. Nem sempre é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos co-dominantes, não permitem essa distinção (LOPES et al., 2002).

Um tipo de marcador dominante é o RAPD. Essa técnica é freqüentemente utilizada na análise de variabilidade em vegetais e animais, por revelar alto grau de polimorfismo, sendo um método rápido e passível de automatização. Entre os marcadores co-dominantes podemos citar os microssatélites que permitem a distinção no gel dos indivíduos homozigotos e heterozigotos.

A técnica de RAPD foi desenvolvida por dois grupos independentemente nos Estados Unidos: WILLIAMS et al. (1990) que empregou o nome comumente utilizado (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e WELSH e McCLELLAND (1990) que propuseram a denominação AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*).

O marcador molecular RAPD utiliza um único iniciador de seqüência arbitrária sendo, portanto, sua seqüência alvo desconhecida. Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao iniciador arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (menor do que 4.000 pb) e em orientações opostas de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. A natureza molecular do polimorfismo de RAPD não é inteiramente conhecida, ou seja, evidências indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para impedir a amplificação de um segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Desta maneira, o polimorfismo genético detectado

pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

No RAPD, tanto o indivíduo homozigoto dominante quanto o heterozigoto apresentam uma banda no gel enquanto o recessivo seria detectado pela ausência da mesma. O indivíduo heterozigoto teria um “alelo” amplificado e o outro não por qualquer um dos motivos vistos anteriormente enquanto o recessivo não amplificaria nenhum deles.

Entre as vantagens desta técnica podemos citar o custo mais baixo, sua simplicidade, rapidez, quantidade mínima de DNA a ser utilizado e não ser necessário o conhecimento prévio do DNA genômico do organismo a ser estudado.

A despeito das vantagens acima citadas, além de ser um marcador dominante o método apresenta algumas outras limitações dentre as quais: baixo conteúdo de informação genética por *locus* e diferentes segmentos amplificados podem migrar para a mesma posição do gel. A fim de minimizar estas desvantagens durante a análise assume-se que diferentes *locus* não devam migrar para a mesma posição no gel e, para fins de análise populacional assume-se que as populações estudadas se encontrem em equilíbrio do Hardy-Weinberg.

Apesar das limitações enumeradas anteriormente o marcador de RAPD é confiável desde que alguns cuidados sejam tomados, dentre os quais, uma boa qualidade e concentração do DNA extraído. A intensidade de uma banda depende da eficácia da interação da sequência do DNA genômico com o iniciador durante o passo inicial. Outros fatores importantes para uma boa amplificação são as concentrações adequadas do $MgCl_2$, Taq DNA polimerase, dNTP e iniciador, sendo este último crucial para o sucesso de qualquer protocolo de RAPD. Finalmente, a temperatura de anelamento mais alta e a padronização correta da reação de acordo com a espécie que se vai trabalhar, serão procedimentos essenciais para que se obtenham bandas nítidas (evitando a presença das expúrias) e que apresentem reprodutibilidade.

Algumas variações foram desenvolvidas a partir da descoberta do marcador molecular de RAPD por WILLIAMS et al. (1990). WELSH e McCLELLAND (1990) propuseram a denominação mais apropriada para a técnica chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*) uma vez que os iniciadores possuem sequência arbitrária, mas a amplificação teoricamente não ocorre ao acaso e sim em

locais específicos do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). De forma independente, um terceiro grupo também desenvolveu o mesmo método denominado de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) proposto por este grupo para detectar diferenças genéticas entre os organismos. A Tabela 1 fornece uma comparação entre estes três procedimentos.

TABELA 1 – DIFERENÇAS ENTRE RAPD, AP-PCR E DAF

Variantes/Técnica	RAPD	AP-PCR	DAF
Comprimento do Iniciador(pb)	10-12	20	5-15
Concentração do Iniciador(μM)	0,3 - 3	3	3 - 30
Anelamento do iniciador (° C)	30 - 36	40 - 60	30
Número de ciclos	40 - 45	40	35
Uso de radioatividade	Não	Sim (α ³² p-dATP- últimos 10 ciclos)	Não
Separação	Agarose	Poliacrilamida	Poliacrilamida
Visualização	Brometo de Etídeo	Rádio	Prata
Tamanho de cadeia dos produtos de PCR (Kb)	0,3 - 4	0,05 – 0,5	0,05 – 0,5

Fonte: ATIENZHAR e JHA (2006)

Outra variante da técnica de RAPD foi desenvolvida por RICHARDSON et al. (1995) a qual foi denominada de RAMPO (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*). O RAMPO *fingerprinting* tem a vantagem das técnicas de detecção de DNA com alta sensibilidade. Bandas de RAPD são transferidas para uma membrana hibridizada com uma sonda com motivos para microssatélite e detectadas por radiografia ou por métodos de detecção fluorescente. Através do uso de métodos sensíveis de coloração, bandas polimórficas que não aparecem por

RAPD poderão se tornar visíveis. Da mesma forma que o RAPD, o RAMPO é de natureza dominante.

Através de bandas geradas pela técnica de RAPD, sondas podem ser obtidas a fim de mapear fisicamente cromossomos específicos utilizando-se a técnica de hibridização *in situ* (ITURRA et al., 1998). Como se podem observar, inúmeras variações obtidas através deste método já foram desenvolvidas desde a sua descoberta por WILIAMS et al. (1990), porém, a técnica tradicional é ainda a mais fácil, rápida e menos dispendiosa quando comparada com as demais.

Existe uma grande preocupação a respeito dos efeitos de contaminantes ambientais sobre a constituição genética de populações naturais. O RAPD e tecnologias similares (AP-PCR e DAF) têm sido utilizados para detectar não somente danos ao DNA e mutações como também mudanças na diversidade e frequências genéticas. Este método foi empregado inicialmente com a finalidade de detectar polimorfismo em estudos de mapeamento genético, taxonomia e filogenia e mais tarde em estudos de genotoxicidade e carcinogênese (ATIENZAR; JHA, 2006).

Este método pode ser utilizado como biomarcador da perda ou ganho da variabilidade genética em organismos que habitam ambientes contaminados como podem ser observados nos trabalhos desenvolvidos por THEODORAKIS e SHUGGART (1997), NADIG, LEE e ADAMS (1998), WOLF, BLUST e BACKELJAU (2004) e SOFIA et al. (2006).

Um outro emprego da técnica de RAPD foi realizado por MARTINEZ e YMAN (1998) para identificar as espécies usadas na manufatura de produtos à base de carnes. Este marcador produziu claros padrões de bandas a partir dos produtos analisados dos quais as espécies anteriormente avaliadas puderam ser comparadas e identificadas.

A técnica de RAPD permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA distribuídos por todo o genoma do organismo sendo que as seqüências internas dos segmentos amplificados podem pertencer a todas as classes do DNA genômico desde seqüência de cópia única até altamente repetitivas.

Devido à sua alta capacidade de detectar polimorfismo de segmentos de DNA este marcador vem sendo amplamente utilizado para o esclarecimento de vários aspectos da variabilidade genética, evolução, filogenia e fisiologia de espécies animais e vegetais (CORAZZA; FORESTI; OLIVEIRA, 2001). Segundo SOUZA e

GALETTI Jr. (2002) este marcador pode ser utilizado em estudos de estruturação populacional fornecendo subsídios a programas voltados para a conservação das espécies.

A diversidade biológica envolve não somente a riqueza de espécies, mas a variação genética intra-específica, cujo conhecimento é essencial para a conservação e a utilização dos recursos genéticos naturais (TABERLET, 1998). Desta forma, a preservação da variabilidade genética das espécies é de fundamental importância para a manutenção da sua estrutura populacional (SODRÉ; ALMEIDA; ORSI, 2001) e tem alta relevância em programas de manejo e de proteção da biodiversidade (PAIVA et al., 2001).

Em peixes, o procedimento de RAPD têm sido usado de forma extensiva fornecendo dados sobre diversidade e diferenciações populacionais (MAMURIS et al., 1998; LIU et al., 1999; KOH et al., 1999), incluindo alguns casos de distinção interespecífica (BARDAKCI; SKIBINSKI, 1994; HATANAKA; GALETTI, 2003) e relações sistemáticas (LEHMANN; HETTWER; TARASCHEWSKI, 2000). Em peixes neotropicais, os marcadores de RAPD têm sido úteis no manejo de espécies em localidades sob ação antrópica, relacionando-se os dados de variabilidade genética com parâmetros ambientais (WASKO; GALETTI Jr., 2002; HATANAKA; GALETTI Jr., 2003) e identificando estruturação de populações (DERGAM et al., 1998, 2002; PRIOLI et al., 2002; WASKO; GALETTI Jr., 2002; HATANAKA; GALETTI Jr., 2003; LEUZZI; ALMEIDA; ORSI, 2004; MATOSO, ARTONI; GALETTI JR., 2004).

No ambiente marinho, o conceito de estoque é fundamental para a pesca e para o manejo de espécies ameaçadas. Somente a partir do entendimento da estrutura de estoques, e de suas diferenças, podem ser designadas medidas apropriadas de manejo, sejam conservacionistas ou exploratórias (BEGG; WALDMAN, 1999). Para obter tais informações sobre os estoques naturais é defendido o emprego de análises genéticas comparativas, uma abordagem ainda subestimada entre os peixes (CAGIGAS et al., 1999; DERGAM et al., 2002; PRIOLI et al., 2002; TAKAHITO; TANIGUCHI, 2002; FUCHS et al., 2003; BARTFAI et al., 2003).

Freqüentemente, mesmo espécies oceânicas, reconhecidas pela capacidade migratória e de dispersão, têm revelado a presença de estoques diferenciados a partir de estudos de RAPD, indicando que o fluxo gênico pode ser restrito, ao

contrário da visão tradicional sobre a composição populacional dos animais desse ambiente (GOMES; DALES; OXENFORD, 1998).

O estudo da variabilidade genética é de fundamental importância para abordagens genéticas para a conservação de peixes ou endocruzamentos, os quais dependem do conhecimento da quantidade de variação existente em um local de unidade reprodutiva (CARVALHO, 1993). De acordo com HAIG (1998), a mais importante contribuição que os geneticistas da conservação podem oferecer é a avaliação da viabilidade das populações e determinar a relativa quantidade de diversidade genética dentro e entre as mesmas.

Considerando as diferentes abordagens, pode-se concluir que o marcador de RAPD é indicado para medir a variabilidade genética dentro e entre os exemplares das diferentes localidades de *Atherinella brasiliensis* da Baía de Barra Grande de Camamú – Maraú (BA), Lagoa de Carapebus – Macaé (RJ), Baía de Laranjeiras e Pontal do Sul pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (PR), Lagoa da Conceição – Florianópolis (SC), Lagoa do Camacho - Laguna (SC) e Lagoa dos Patos – Rio Grande (RS).

1.3 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA RAPD NO GENOMA DOS PEIXES

A técnica de RAPD tem sido amplamente utilizada como marcador molecular da variabilidade genética em plantas e animais, pois permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA distribuído por todo o genoma dos organismos estudados.

Variações interpopulacionais e interespecíficas, em peixes têm sido detectadas através desta técnica, principalmente em função da grande quantidade de iniciadores disponíveis que podem ser utilizados, cada um detectando variações em algumas regiões do genoma (BARDAKCI; SKIBINSKI, 1994). A análise pode ser mais sensível que métodos mais tradicionais como isoenzimas ou mtDNA, uma vez que envolve regiões não codificantes, neutras, as quais permitem altas taxas de mutação (WILLIAMS; KAZIANIS; WALTER, 1998).

DAHLE, RAHMAN e ERIKSEN (1997) utilizaram o método de RAPD para investigar a variação genética de três populações do peixe Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) das localidades de Chandpur (água doce), Barguna (água salobra) e Cox's Bazar (água salgada), da Baía de Bengala, Bangladesh. Segundo os autores acima citados, a técnica de RAPD indicou alta variabilidade dentro e entre as populações analisadas.

Os robalos listrados da costa Atlântica são peixes endêmicos e anádromos que exibem excepcionalmente baixos níveis de variação genética. O método de RAPD foi empregado por BIELAWSKI e PUMO (1997) para detectar a variabilidade genética em cinco populações de peixes da espécie *Morone saxatilis* dos rios Hudson, rio Delaware, rio Choptank e rio Potomac da Baía Chesapeake e do rio Roanoke pertencentes à costa Atlântica. Os resultados indicaram uma maior similaridade dos indivíduos dentro dos sistemas de rios, com uma diferenciação genética maior entre os mesmos. Estes dados são concordantes com os encontrados para mtDNA sugerindo divergência genética entre os robalos listrados da costa Atlântica e demonstrando que o marcador RAPD é confiável para verificar a estruturação genética entre indivíduos pertencentes à mesma espécie.

FUCHS et al. (1998) empregaram os marcadores de RAPD, RAMPO (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*), SCAR (*Sequence - Characterized Amplified Regions*), Microsatélite e Heteroduplex para diferenciar duas populações

do peixe *Abramis brama* L. do rio Main e três do rio Danúbio (Alemanha). Os resultados encontrados apresentavam variação entre as populações dos diferentes sistemas de rios bem como variação entre amostras da mesma bacia. Os dados obtidos através da técnica de RAPD foram corroborados pelos demais marcadores confirmando ser este método confiável para avaliar a estruturação genética entre populações de uma mesma espécie.

Utilizando sete iniciadores através do método de RAPD, seis bandas diagnósticas foram encontradas para a identificação das espécies endêmicas espanholas *Barbus bocagei*, *Barbus graellsii* e *Barbus sclateri* (CALLEJAS; OCHANDO, 1998) residentes na Península Ibérica. Apesar de serem morfologicamente similares, os valores de diferenciação genética indicaram que as espécies *Barbus bocagei* e *Barbus graellsii* são mais relacionadas entre si do que a *Barbus sclateri*.

Marcadores RAPD podem ser convertidos em sondas com o objetivo de mapear fisicamente cromossomos específicos através da técnica de hibridização *in situ*. Este foi o objetivo do trabalho desenvolvido por ITURRA et al. (1998) onde machos da espécie *Onchorhynchus mykiss* (truta) de Mount Lassen Trout Farm (Califórnia) e da variedade Scottish (mantida em Rio Branco – V Região – Chile) foram identificados como portadores de uma banda polimórfica de 900 pb. Esta foi utilizada como sonda para identificação do sexo revelando um sinal brilhante em um cromossomo que seria morfologicamente classificado como o Y nesta espécie.

O método de RAPD foi utilizado para examinar a variabilidade e estruturação populacional em peixes voadores, *Hirundichthys affinis* do Atlântico centro-oeste (GOMES; DALES; OXENFORD, 1998). Foram identificados 58 marcadores polimórficos RAPD, 20 dos quais eram específicos da população e seis dos quais eram sub-regionais ou marcadores estoque-específicos. A análise de similaridade indicou a presença de três estoques geneticamente distintos, sub-regionais, localizados no leste do Caribe, Sul das Antilhas e Brasil. Estes resultados foram consistentes com análises obtidas com a PCR-RFLP e mtDNA-Dloop no mesmo peixe indicando a presença de barreiras para a dispersão e intercruzamento em ambos os sexos.

Devido à importância econômica do peixe *Salmo trutta* para a pesca esportiva e a aquacultura, estudos genéticos têm sido estimulados para esta espécie.

CAGIGAS et al. (1999) analisaram 88 exemplares pertencentes a quatro riachos espanhóis através dos marcadores RAPD, aloenzimas e microsatélites que forneceram valores de diversidade genética, frequência alélica e número médio de alelos respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a maior parte da variação genética está distribuída dentro das populações sendo maior para aloenzimas do que para os marcadores de DNA enquanto a média de distância genética era mais alta para os microsatélites do que para o RAPD e aloenzimas. A alta concordância nos resultados obtidos entre os métodos empregados fez com que os autores sugerissem que qualquer um destes marcadores eram capazes de verificar o relacionamento entre as populações analisadas.

Entender padrões de dispersão em populações e sua consequência evolucionária é a chave para a questão em ecologia. Para peixes, a disponibilidade do oxigênio dissolvido é um fator abiótico que tem limitado a qualidade do hábitat e padrões de dispersão. A fim de examinar esta idéia, CHAPMAN et al. (1999) compararam o tamanho da guelra de um pequeno ciprinídeo africano *Barbus neumayeri* de uma região de pântano (Rwembaita Swamp) com baixa disponibilidade de oxigênio com uma população do rio Mpanga. As duas localidades apresentavam uma distância de sete km e se encontravam numa mesma área de drenagem. Além desta característica, os autores examinaram as taxas de dispersão entre os exemplares dos dois locais e finalmente através da técnica de RAPD quantificaram a variabilidade genética entre as mesmas. Os resultados indicaram uma alta taxa de diferenciação genética associada à diferença significativa na morfologia das guelras em resposta à variação de oxigênio. Através dos dados obtidos os autores sugeriram não existir relacionamento entre distância geográfica e diferenciação genética visto que o movimento entre as populações é teoricamente suficiente para homogeneizar a frequência dos genes e que, a diferenciação genética entre as populações poderia estar refletindo uma pressão seletiva hábitat-específica.

TAKAHITO e TANIGUCHI (2002) utilizaram os marcadores moleculares microsatélites e RAPD como uma ferramenta para estimar a quantidade de heteroze em várias combinações de classes do peixe *Poecilia reticulata* de quatro laboratórios experimentais da Escola de Graduação em Ciências da Agricultura – Universidade de Tchoku, Japão. A tolerância à salinidade, medida pelo tempo de

sobrevivência após transferência da água doce para salgada foi usada como um índice para medir a quantidade de heterose. Os resultados indicaram que ambos: a distância genética de Nei (medida pelo marcador microssatélite) e a dissimilaridade (medida pelo marcador RAPD) eram mais altos nas combinações de classe que tinham parentesco distante. O mais importante resultado obtido através deste trabalho foi que a quantidade de heterose e conseqüentemente o rendimento da F_1 está positivamente relacionado com ambos: a distância genética e a dissimilaridade entre as classes usadas no cruzamento. Os autores sugerem que estes marcadores são úteis para medir a média e variância da quantidade de heterose nas várias combinações de classes.

Uma linhagem completa da prole de duas fazendas de carpas comuns (*Cyprinus carpio carpio*, *C. carpio haematopterus* e *C. carpio viridiviolaceus*) da Hungria foram analisados usando dez marcadores polimórficos de RAPD e quatro de microssatélites (BARTFAI et al., 2003). A análise por microssatélites revelou detalhes mais informativos da diversidade genética do que o ensaio RAPD, porém os resultados obtidos com ambos os tipos de marcadores de DNA apresentou falta de maiores diferenças entre as estruturas genéticas dos dois estoques. Tanto a frequência das bandas de RAPD quanto às frequências alélicas dos microssatélites eram muito similares. A partir dos dados obtidos os autores sugeriram que o marcador RAPD é confiável para determinação da variabilidade genética entre estoques da mesma espécie.

HASSANIEN et al. (2004) avaliaram através da técnica RAPD a diversidade genética de *Oreochromis niloticus* (tilápia) do rio Nilo - Egito (populações Cairo, Assuit e Qena) e do Lago Delta (populações Burullus e Manzalla). A percentagem de bandas polimórficas nas populações Manzalla (29,4%) e Burullus (24%) foi baixa comparada com as populações de Assuit (30,54%), Cairo (33,5%) e Qena (44,84%). A árvore molecular filogenética construída pelo método UPGMA mostrou as populações de Manzalla e Burullus altamente ligadas e separadas das populações de Assuit e Cairo, tendo Qena como grupo externo. Estes dados servem como uma primeira análise da diversidade genética entre as populações de tilápias (*Oreochromis niloticus*) do Egito através do marcador molecular RAPD.

Desde a descoberta da técnica de RAPD por WILLIAMS et al. (1990) somente em 1998 foi publicado por DERGAM et al. (1998) o primeiro trabalho utilizando este

marcador para o entendimento da distribuição geográfica e diversidade de peixes neotropicais de água doce no Brasil. Apesar do grande número de trabalhos usando este método no mundo, o Brasil ainda apresenta uma grande defasagem, sendo que os artigos encontrados nesta área estão restritos a peixes de águas continentais.

DERGAM et al. (1998) utilizaram os padrões de similaridade genética, baseados em marcadores de RAPD como forma de avaliar a diferenciação genética de *Hoplias malabaricus* (traíras) oriundas dos rios Iguaçu, Paraná e Tibagi que são bacias geograficamente vizinhas. Baseando-se nos dados obtidos, os autores sugeriram a ocorrência de alta estruturação populacional desta espécie nos rios Paraná e Tibagi. Devido à semelhança entre os alelos da cabeceira do rio Tibagi e as amostras do rio Iguaçu sugeriram também que a população do primeiro possa ser a origem das populações amostradas no segundo.

A taxonomia dentro do gênero *Hoplias* é confusa, com conflitos entre autores quanto ao número de espécies. Apesar de morfologicamente várias populações serem enquadradas dentro da espécie *Hoplias malabaricus*, vários citótipos diferentes tem sido encontrados ou diferenças cariotípicas significativas. Com o auxílio da técnica de RAPD, PRIOLI et al. (2000) analisaram o polimorfismo existente entre os peixes desta espécie encontrados nos rios: Formoso, Araguaia, Jacuba, Manso e alguns indivíduos coletados na planície de inundação do alto rio Paraná. Através da análise dos resultados os autores detectaram três grupos de indivíduos no alto rio Paraná enquanto nos demais grupos (rio Formoso, Araguaia, Jacuba e Manso) todos apresentaram padrões eletroforéticos semelhantes. Estes dados forneceram um indicativo de que estas populações teriam origem geográfica comum. Segundo os autores, como alguns desses rios não se comunicam, a semelhança de padrões possivelmente seria resultante de interferência humana ou de aves.

A planície de inundação do alto rio Paraná consiste no único trecho livre de represamento do rio Paraná, em território brasileiro, após o fechamento da barragem de Porto Primavera. Apesar do fato de *Gymnotus cf. carapo* ser uma espécie não migradora, residente desta planície e o fato de o pulso de inundação transformar a planície em praticamente um só corpo d'água, permite levantar a hipótese de que esta espécie apresentaria alta homogeneidade. Devido a este fato, PRIOLI et al.

(2000) tiveram como objetivo em seu trabalho medir a variabilidade e a distância genética de 36 exemplares de três lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná através da técnica de RAPD. Os resultados deste trabalho indicaram a ocorrência de um isolamento entre as populações com estruturação das mesmas. Os autores sugeriram que apesar do *Gymnotus cf. carapo* ser uma espécie não migradora, o pulso de inundação não teve tempo de promover a homogeneização das mesmas.

Quantificar a variabilidade genética de oito espécies de peixes da família Anostomidae através do método de RAPD foi o objetivo do trabalho desenvolvido por CHIARI e SODRÉ (2001). As espécies analisadas foram: *Leporinus amblyrhynchus*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Leporinus obtusidens*, *Leporinus octofasciatus*, *Leporinus straitus*, *Schizodon intermedius* e *Schizodon nasutus*. Os exemplares foram coletados de nove localidades ao longo da bacia do rio Tibagi (Paraná, Brasil). Através dos resultados obtidos foi possível discriminar as duas espécies de *Schizodon* do gênero *Leporinus*, no entanto não foi possível discriminar *Leporinus obtusidens* de *Leporinus elongatus*. A análise de RAPD indica que estas duas espécies são geneticamente muito similares, conclusão também sustentada por dados de isoenzimas.

Variabilidade genética em três espécies de Pimelodidae catfish (*Iheringichthys labrosus*, *Pimelodus maculatus* e *Pimelodus cf. absconditus*) foi analisada com o emprego das técnicas de RAPD e isoenzimas por ALMEIDA, FUNGARO e SODRÉ (2001). Os exemplares foram coletados em quatro localidades na bacia do rio Tibagi: Sertaneja, Londrina, Saponema e Tibagi. Apesar da alta similaridade entre *I. labrosus* e *P. cf. absconditus* os resultados encontrados através destes dois marcadores demonstraram que estes peixes pertencem a espécies diferentes.

OLIVEIRA et al. (2002) estimaram a variabilidade e a distância genética em populações do gênero *Steindachnerina* da planície de inundação do Alto Rio Paraná utilizando o marcador molecular RAPD. O objetivo deste trabalho foi obter indicações a respeito de uma provável homogeneização genética na região entre as espécies *S. insculpta* (sem mácula na nadadeira dorsal) e *S. brevipinna* (com mácula escura na nadadeira dorsal) devido ao aparecimento de indivíduos com mácula intermediária. Os fragmentos observados nos indivíduos analisados mostraram um alto grau de polimorfismo e, grande parte deles foram exclusivos de uma ou outra

população. Os valores de distância genética entre ambas as populações indicaram ser de espécies diferentes.

Diversidade genética e suas implicações para a conservação das espécies foram analisadas através da técnica molecular de RAPD por WASKO e GALETTI Jr. (2002) no peixe *Brycon lundii*. Exemplares desta espécie foram coletados em duas regiões com condições ambientais distintas do alto rio São Francisco: a primeira população mais próxima da represa hidrelétrica (com baixa vazão de água, temperatura e oxigênio) e a segunda localizada 20 km abaixo da mesma (com alta vazão de água, temperatura e oxigênio). Variações genéticas foram encontradas entre as amostras coletadas nas duas regiões indicando uma possível correlação entre variação genética e área geográfica. Os autores propõem através da análise um modelo de estruturação populacional para o peixe *Brycon lundii* das duas regiões amostradas sugerindo a presença de diferentes genes *pool* co-existindo.

Analisar o relacionamento genético entre duas populações de *Astyanax altiparanae* da bacia do alto rio Paraná e uma população identificada como *Astyanax bimaculatus* da bacia do rio Iguaçu foi o objetivo do trabalho desenvolvido por PRIOLI et al. (2002). Os marcadores utilizados neste trabalho foram o RAPD e o mtDNA. Os resultados obtidos revelaram uma alta diversidade genética dentro de cada população com baixa distância genética e alto fluxo gênico demonstrando alta similaridade entre as três populações analisadas. Juntamente com similaridades morfológicas estes resultados demonstraram que a população presentemente chamada de *Astyanax bimaculatus* do rio Iguaçu poderia ser chamada de *Astyanax altiparanae*. Os autores sugerem que a população de *Astyanax altiparanae* não é endêmica e mais provavelmente foi introduzida recentemente na bacia do rio Iguaçu.

DERGAM et al. (2002) utilizando o marcador de RAPD bem como sequências do gene mitocôndrial 16S interpretaram as diferenças genéticas observadas em *Hoplias malabaricus* da bacia do rio Doce, sudeste do Brasil, como o resultado de processos evolutivos diversos tais como: pressão de seleção, deriva genética, vicariância e efeito do fundador. Através dos dados obtidos com os dois marcadores os autores constataram uma complexa história filogeográfica envolvendo a bacia do rio Doce e outras bacias adjacentes. A principal conclusão foi a de que a bacia do rio Doce compartilha uma história comum com as vertentes das bacias dos rios Paraíba do Sul e Grande, corroborando a hipótese de suas separações pela formação da

Serra da Mantiqueira durante o período Plio-Pleistoceno.

HATANAKA e GALETTI Jr. (2003) detectaram a variabilidade genética em *Prochilodus marggravii* de três locais na área de influência da represa de Três Marias (MG) no rio São Francisco usando a técnica RAPD. Os resultados obtidos revelaram que os indivíduos coletados nos locais abaixo e próximos à represa apresentavam um coeficiente de similaridade mais alto do que as demais amostras coletadas em localidades afastadas da mesma. Segundo os autores este fato pode estar relacionado a diferenças nas características ambientais destas regiões. Através dos dados obtidos sugerem a ocorrência de uma estruturação populacional com importante implicação para a conservação da variabilidade genética da distinta população natural de *P. marggravii*.

Populações de *Pimelodus maculatus* do Rio Tietê e do Rio Paranapanema foram amostradas e tiveram sua estrutura genética analisada através do marcador molecular RAPD por ALMEIDA, SODRÉ e CONTEL (2003) com o objetivo de contribuir para futuros estudos de conservação desta espécie. A proporção de *loci* polimórficos foi maior do que 50% nas populações de ambos os rios. Dados da diversidade genética apresentaram que a despeito das nove represas hidrelétricas existentes no Rio Tietê a população se encontrava geneticamente homogênea, enquanto que no Rio Paranapanema a população se encontrava estruturada. Este fato, segundo os autores, poderia ser devido à presença de altas quedas d'água distribuídas ao longo do curso do rio.

O peixe *Astyanax sp* apresenta uma larga distribuição em rios neotropicais com ocorrência de uma extensiva variação morfológica e cromossômica. Devido a este fato, MATOSO, ARTONI e GALETTI Jr. (2004) empregaram o marcador molecular RAPD para detectar a variabilidade genética através da técnica de RAPD em 36 exemplares coletados em três diferentes locais: sendo dois do parque de Vila Velha do Estado do Paraná e um do rio Tibagi (Paraná, Brasil). Os resultados indicaram uma alta variação genética entre os exemplares das três localidades sendo que os indivíduos de um dos locais do Parque de Vila Velha apresentaram um alto grau de similaridade genética intrapopulacional. Os autores sugerem que esta perda poderia ocorrer por endogamia ou deriva genética baseada no efeito do fundador sendo que as diferenças genéticas encontradas poderiam ter sido promovidas pela variação ambiental.

A formação de represas para a construção de usinas hidroelétricas é uma das mais sérias alterações ambientais para as espécies terrestres ou aquáticas. Os reservatórios causam modificações nos padrões de dispersão de várias espécies de peixes migratórios e, sobre certas condições, podem levar a extinção de espécies que não conseguem se adaptar às novas mudanças do ambiente. Devido a estas alterações LEUZZI, ALMEIDA e ORSI (2004) utilizaram a técnica de RAPD para avaliar a estrutura genética de seis populações do peixe *Astyanax altiparanae* que habitam o baixo, médio e alto rio Paranapanema (Paraná, Brasil). Os resultados indicaram que os exemplares do baixo Paranapanema são altamente diferenciados do médio e alto enquanto a diferenciação entre estes dois é moderada. Os dados obtidos levaram os autores a sugerirem a ocorrência de estruturação populacional entre as populações destas três localidades.

Apesar da grande interferência antropogênica em riachos urbanos, informações são ainda escassas sobre a variabilidade e estrutura genética de populações de peixes nativos que habitam tais ambientes. SOFIA et al. (2006) avaliaram a variabilidade e estrutura genética de três populações de peixes da espécie *Astyanax scabripinnis* coletadas ao longo do riacho Cambé localizado em Londrina (Paraná, Brasil) através da técnica de RAPD. Análises realizadas neste riacho apresentaram grandes quantidades de metais principalmente chumbo e alumínio. Os resultados encontrados através deste marcador sugeriram que as populações de *A. scabripinnis* do riacho Cambé se encontram estruturadas não sendo possível determinar os fatores evolutivos responsáveis pela mesma.

Os trabalhos acima citados utilizando a técnica RAPD referiam-se a peixes neotropicais de águas continentais. A costa brasileira apresenta cerca de 8.500 km de extensão e possui milhares de peixes de espécies diferentes, porém, poucos estudos tem sido realizados até o momento utilizando esta técnica em peixes marinhos e/ou estuarinos.

AFFONSO (2004) utilizou a técnica de RAPD para determinar a variabilidade genética e a composição populacional entre espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae de ambientes recifais do litoral Nordeste e Sudeste do Brasil, além de ilhas oceânicas. As espécies selecionadas foram *Centropyge aurantonotus*, *Holacanthus ciliaris*, *Holacanthus tricolor*, *Pomacanthus arcuatus*, *Pomacanthus paru* (Pomacanthidae) com ocorrência ao longo de quase todo o litoral do Brasil e

Chaetodon striatus (Chaetodontidae) pertencente a uma família intimamente relacionada. Os resultados obtidos com as análises por RAPD indicaram que as espécies dessas famílias apresentam alta variabilidade genética, com diferenças interespecíficas e interpopulacionais. O autor sugere que a metodologia utilizada com o marcador molecular RAPD foi informativa na identificação das espécies e útil para comparações intra e interespecíficas.

Com base nos trabalhos anteriores, utilizou-se neste a técnica de RAPD para detectar variabilidade intra e interespecíficas nos exemplares das diferentes localidades de *Atherinella brasiliensis* da Baía de Barra Grande de Camamú – Marau (BA), Lagoa de Carapebus – Macaé (RJ), Baía de Laranjeiras e Pontal do Sul pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (PR), Lagoa da Conceição – Florianópolis (SC), Lagoa do Camacho - Laguna (SC) e Lagoa dos Patos – Rio Grande (RS). O conhecimento da estrutura genética e populacional será de grande valia para estudos futuros dentro da área da conservação, manutenção da biodiversidade e manejo visto ser esta espécie importante fonte de renda e alimento para as comunidades locais.

2 OBJETIVO

Devido aos resultados encontrados no estudo realizado por DA SILVA CORTINHAS et al. (2003) e a grande abundância e permanência da espécie *Atherinella brasiliensis* em ambientes estuarinos fazendo com que represente uma importante fonte de renda e complemento alimentar para as populações locais, este trabalho teve como objetivo: estimar a diversidade dos exemplares de *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae) oriundas da Baía de Barra Grande de Camamu – Marau (BA), Lagoa de Carapebus – Macaé (RJ), Baía de Laranjeiras e Pontal do Sul pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (PR), Lagoa da Conceição - Florianópolis (SC), Lagoa do Camacho - Laguna (SC) e Lagoa dos Patos – Rio Grande (RS) utilizando para tal abordagem marcadores RAPD.

Para alcançar o objetivo proposto consideraram-se como metas:

- a) gerar dados moleculares (DNA) que permitiram distinguir populações geneticamente diferentes de *A. brasiliensis*;
- b) avaliar a variabilidade genética das populações de *A. brasiliensis*, nas regiões destacadas acima, através do marcador RAPD;

Desta forma, tais metas permitiram responder às seguintes perguntas:

- a) existe diversidade genética nuclear entre as populações analisadas de *A. brasiliensis*?
- b) os indivíduos analisados de *A. brasiliensis* oriundos das diferentes localidades geográficas constituem de fato populações distintas umas das outras?
- c) as populações estudadas de *A. brasiliensis* se encontram em processo de especiação?

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foram analisados 210 exemplares de *Atherinella brasiliensis* (Figura 1), sendo:

- 30 de Pontal do Sul pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá – PR (25° 34' S / 48° 21' W) (Figura 2);
- 30 de Laranjeiras pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá - PR (25° 35' S / 48° 19' W) (Figura 2);
- 30 da Lagoa da Conceição – Florianópolis - SC (27° 35' S / 48° 15' W) (Figura 3);
- 30 da Lagoa do Camacho – Laguna – SC (28° 28' S / 48° 46' W) (Figura 4);
- 30 da Lagoa dos Patos (Ponta da Marambaia) – RS (29° 43' S / 51° 7' W) (Figura 5);
- 30 da Lagoa de Carapebus – Macaé – RJ (20° 07' S / 40° 18' W) (Figura 6);
- 30 da Barra Grande de Camamu – Maraú – BA (13° 57' S / 39° 08' W) (Figura 7).

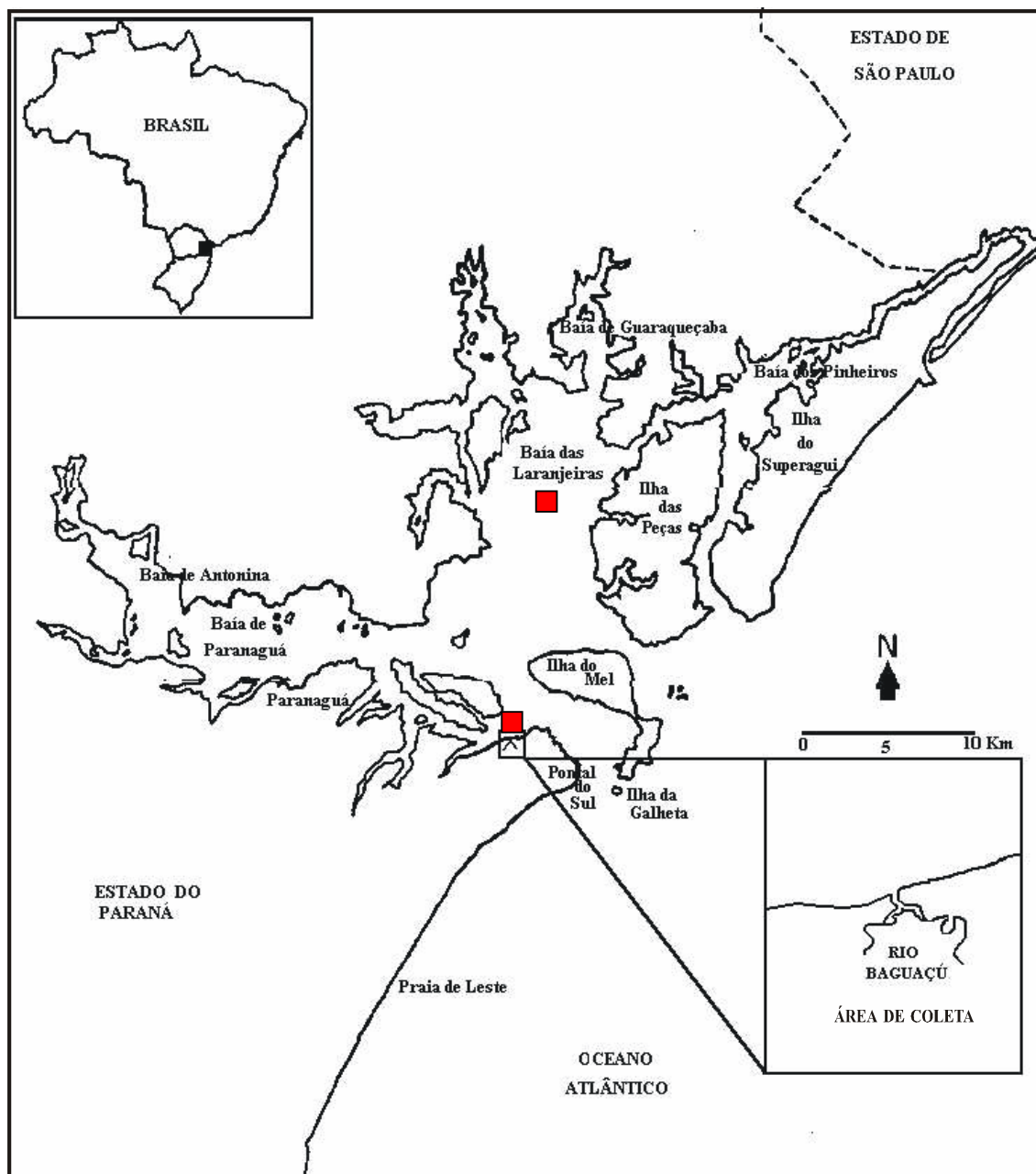
E seis exemplares de *Odontesthes argentinensis* da Lagoa dos Patos (Ponta da Marambaia) – RS (29° 43' S / 51° 7' W) (Figura 5).

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE *Atherinella brasiliensis*



FONTE: Luis Fernando Favaro

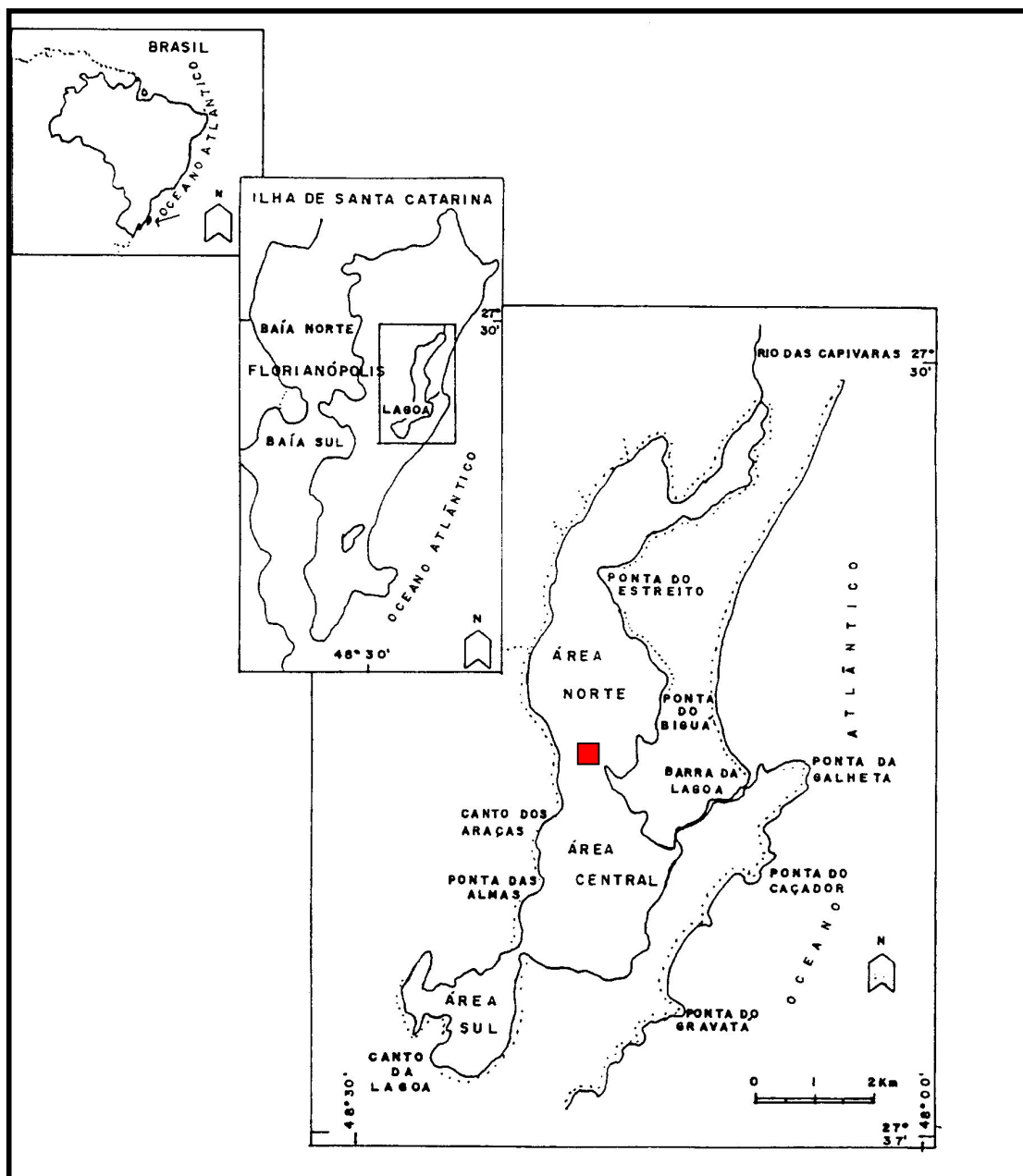
FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO COMPLEXO ESTUARINO BAÍA DE PARANAGUÁ (PR)



FONTE: CENTRO DE ESTUDOS DO MAR (CEM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NOTA: Os quadrados vermelhos da figura indicam as áreas de coleta das duas populações

FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DA CONCEIÇÃO (SC)



FONTE: PORTO FILHO (1993)

NOTA: O quadrado vermelho indica a área de coleta

FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DO CAMACHO (SC)

a) Laguna



FONTE: Governo de Santa Catarina.

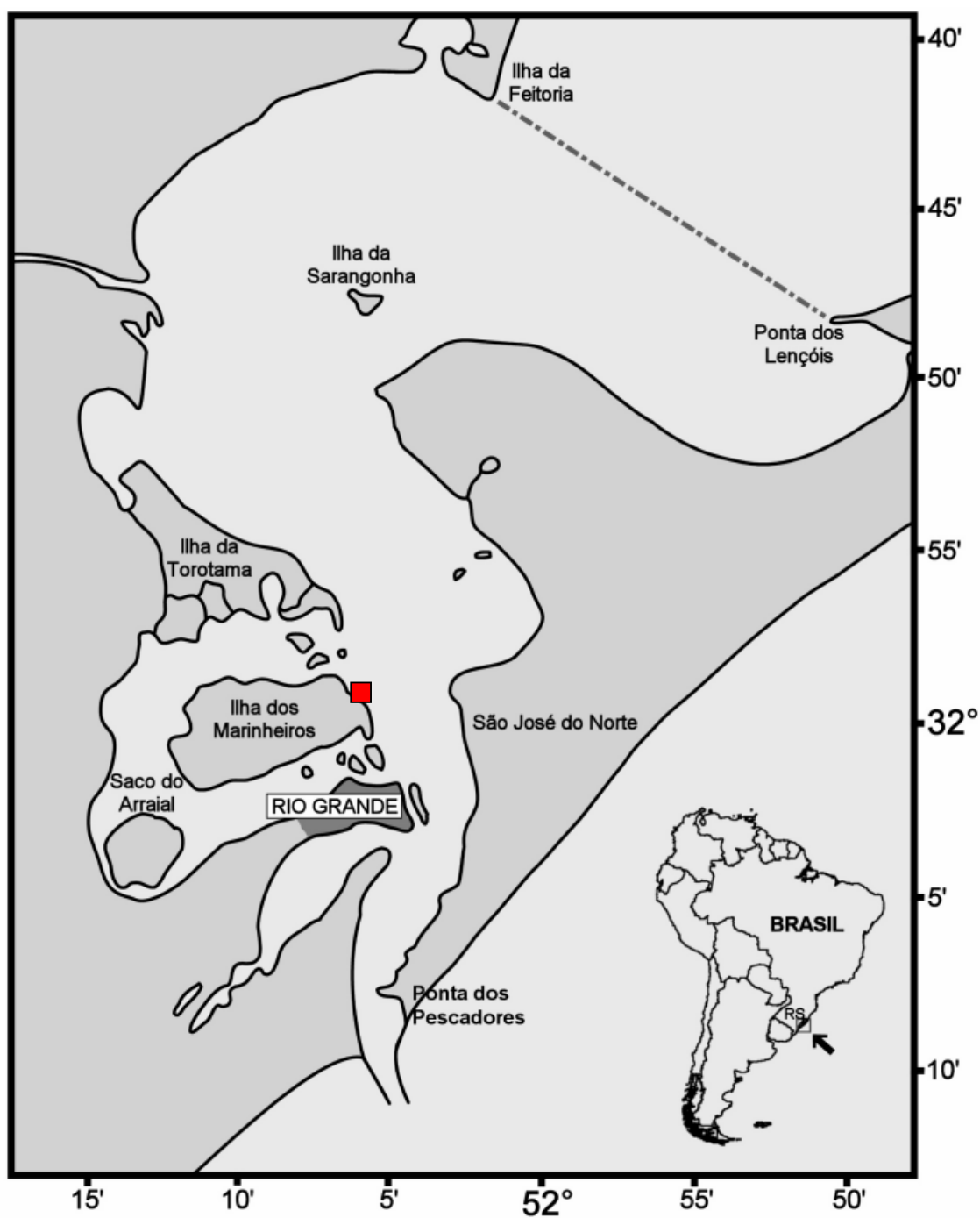
b) Lagoa do Camacho



FONTE: NASA WORLD WIND 2005

NOTA: O quadrado vermelho indica a área de coleta

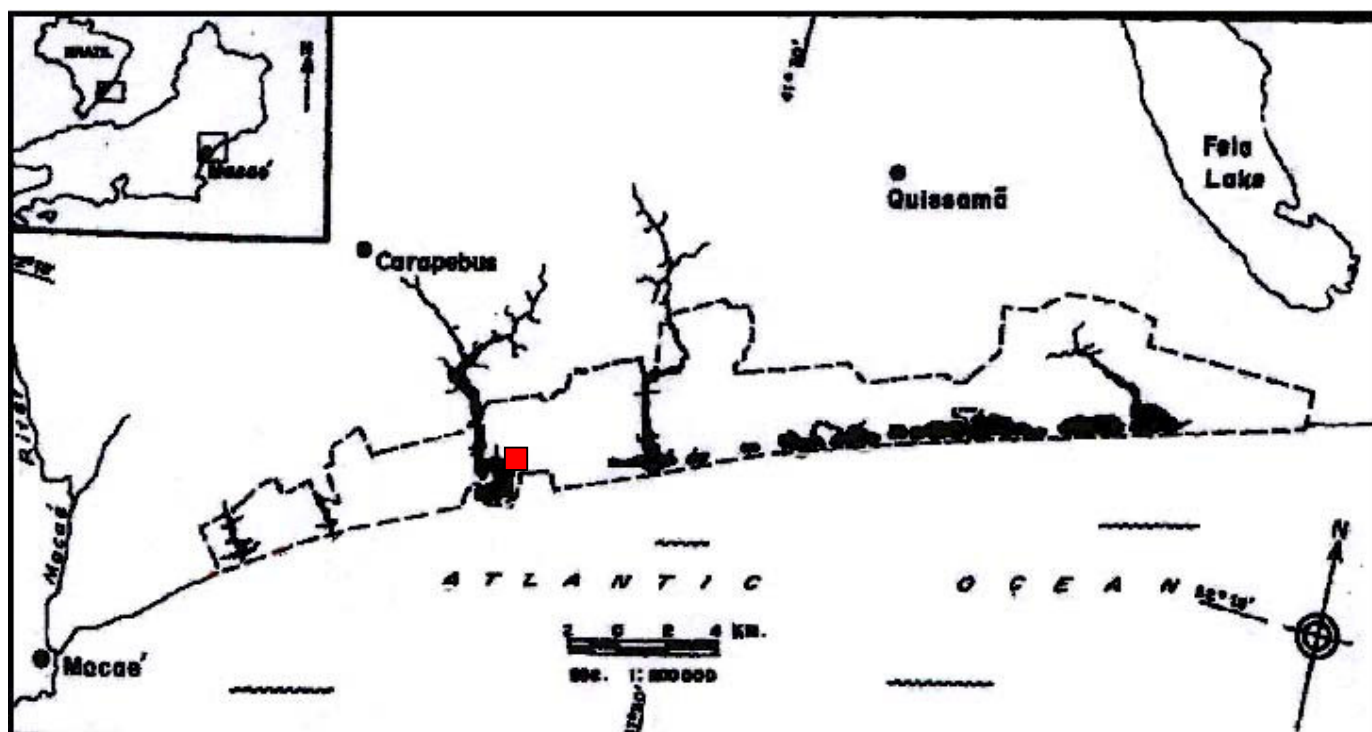
FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DOS PATOS (RS)



FONTE: Departamento de Oceanografia, Laboratório de Ictiologia – FURG

NOTA: O quadrado vermelho indica a área de coleta

FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA LAGOA DE CARAPEBUS (RJ)



FONTE: Laboratório de Ecologia de Peixes da UFRJ

NOTA: O quadrado vermelho indica a área de coleta

FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA BARRA GRANDE DE CAMAMU (BA)



Fonte: www.barragrandeturismo.com.br/mapaviario.htm

NOTA: O quadrado vermelho indica a área de coleta

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Das Coletas

Os exemplares das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras pertencentes ao Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá – PR (Figura 8a e 8b), da Lagoa dos Patos – RS (Figura 9), da Lagoa de Carapebus - RJ (Figura 10) e da Praia Grande de Camamú (BA) foram capturados com rede de arrasto de praia. Devido a este artefato de pesca ser proibido na Lagoa da Conceição (Figura 11) e na Lagoa do Camacho (Figura 12) no estado de Santa Catarina, os exemplares destas duas localidades foram capturados com a utilização de tarrafa.

Os peixes foram retirados da rede de arrasto de praia e da tarrafa cuidadosamente e colocados em sacos plásticos contendo etanol 96%.

No laboratório de Citogenética Animal da UFPR, os exemplares foram registrados, foi retirada uma amostra de aproximadamente 1 cm do músculo dorsal, colocados em microtubos com etanol 96%, enumerados e colocados no freezer a – 20° C.

FIGURA 8 - LOCAIS DE COLETA DE *Atherinella brasiliensis* DO COMPLEXO ESTUARINO DA BAÍA DE PARANAGUÁ (PR)

a) PONTAL DO SUL



b) LARANJEIRAS



FIGURA 9 – LOCAL DE COLETA DE *Atherinella brasiliensis* DA LAGOA DOS PATOS (RS)



FONTE: Marlise de Azevedo Bemvenuti

FIGURA 10– LOCAL DE COLETA DE *Atherinella brasiliensis* DA LAGOA DE CARAPEBUS (RJ)



FONTE: Pedro Soares

FIGURA 11– LOCAL DE COLETA DE *Atherinella brasiliensis* DA LAGOA DA CONCEIÇÃO (SC)



FONTE: Marta Margarete Cestari

FIGURA 12– LOCAL DE COLETA DE *Atherinella brasiliensis* DA LAGOA DO CAMACHO (SC)



FONTE: Marta Margarete Cestari

3.2.2 Extração do DNA Genômico

A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico foi a do fenol/clorofórmio segundo SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, (1989) com algumas modificações.

- Foi retirada uma amostra de tecido muscular de ± 100 mg, colocada num cadinho, adicionado nitrogênio líquido, e macerado;
- Após ser macerado, o tecido foi colocado em um microtubo de 2 mL, onde foram adicionados 500 μ L de tampão TH (mexido levemente), 500 μ L de tampão PS (mexido levemente) e 3 μ L de proteinase K (20 mg/ml);
- Foi deixado no banho-maria a $50^{\circ}\text{C} \pm$ uma hora (após 30 minutos do tempo inicial foram adicionados mais 3 μ L de proteinase K);
- Transcorrido o tempo, a amostra foi dividida em dois microtubos, onde foram adicionados 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio;
- Após, foram levemente agitados (em torno de 90 vezes contando ida e volta);
- As amostras foram colocadas na centrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos;
- O sobrenadante foi retirado e colocado em microtubos onde foram adicionados 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio sendo levemente agitados (em torno de 90 vezes contando ida e volta);
- As amostras foram colocadas na centrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos;
- Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e colocado em outros dois microtubos e adicionado o mesmo volume de clorofórmio (foi mexido levemente);
- As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos;
- O sobrenadante foi retirado e adicionado NaCl (5 M) na proporção: 20 μ L de NaCl para cada 480 μ L de amostra e o dobro do volume total de etanol 100%;
- Foi levemente mexido (observar-se-á a precipitação do DNA);
- As amostras foram deixadas no freezer *overnight*;
- No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos, sendo a seguir descartado o sobrenadante;
- Foi adicionado às amostras 700 μ L de etanol 70% e centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos;

- O sobrenadante foi descartado (tomando cuidado para não deslocar o DNA do fundo do microtubo);
- As amostras foram lavadas com 500 μ L de etanol 100% (PA);
- A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos;
- O sobrenadante foi descartado e o *pellet* deixado secar ao ar até evaporar bem o álcool;
- O *pellet* foi ressuscitado em 1/10 de tampão TE (60 μ L) + RNase (1 μ L) (10 mg/mL);
- Foi levado ao banho-maria a 37°C por aproximadamente 1 hora e após guardado em freezer;
- A quantidade de DNA presente nas amostras foi estimada através da comparação com o DNA do fago λ de concentração conhecida (5, 10 e 20 ng), por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% durante 1,30 minutos a 100 volts. A corrida no gel permitiu também verificar a integridade do DNA extraído. Para a comparação com o DNA do fago λ pingou-se 5 μ L de cada uma das amostras de diferentes concentrações (5, 10 e 20 ng) do mesmo acrescidos de 2 μ L da solução de azul de bromofenol. Do DNA total extraído de *Atherinella brasiliensis* pingou-se 2 μ L acrescidos de 1 μ L da solução azul de bromofenol. As amostras foram coradas com brometo de etídeo, visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas pela câmera Olympus modelo C-3040Zoom sendo a imagem capturada através do programa Shortcut-to-digiDoc-it.

O preparo dos tampões e soluções utilizados na extração e quantificação do DNA estão disponíveis no Apêndice 1 no final do trabalho.

3.2.3 Amplificação das Bandas de RAPD

A amplificação das bandas RAPD foi feita via PCR, baseada nas condições de BARDAKCI e SKIBINSKI (1994), com mistura de reação de volume total igual a 13 μ L, contendo:

- 10 ng de DNA;
- 0,46 μ M de iniciador;
- 1U de Taq-DNA Polimerase;
- 200 μ M de dNTP mix;
- 2 mM $MgCl_2$;
- Tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e KCl 50 mM);
- Água miliQ autoclavada suficiente para completar o volume.

Para se chegar às concentrações adequadas de $MgCl_2$ e DNA realizaram-se alguns testes a fim de se obter um padrão fidedigno de bandas. Desta forma, evitou-se a presença de bandas expúrias, mantendo-se um número que se adequasse às análises propostas.

Nos testes utilizaram-se amostras de DNA de 15 representantes de *Atherinella brasiliensis* sendo cinco pertencentes a cada uma das três localidades inicialmente analisadas, ou seja, Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC).

Realizaram-se diferentes combinações de testes variando a concentração de $MgCl_2$ (1,15, 2 e 2,7 mM) e DNA (10 e 20 ng), sendo mantidos os demais reagentes da reação. Este procedimento teve como objetivo obter um perfil de bandas nítido para uma melhor análise dos resultados e identificou como melhores concentrações a de 2 mM para o $MgCl_2$ e de 10 ng para o DNA.

Após a padronização da reação de RAPD, foram testados 24 iniciadores dos Kits OPA, OPE, OPK, OPX e OPW (*Operon Technologies Inc.*, Alameda, CA, EUA) para a seleção dos oligonucleotídeos que foram utilizados neste trabalho.

Segue abaixo a relação dos iniciadores utilizados no teste:

- OPA01 (5'-CAGGCCCTTC-3');
- OPA06 (5'-GGTCCCTGAC-3');
- OPA07 (5'-GAACGGGTG-3');
- OPE09 (5'-CTTCACCCGA-3');
- OPK04 (5'-CCGCCCAAAG-3');
- OPK14 (5'-CCCGCTACAC-3')
- OPX04 (5'-CCGCTACCGA-3');
- OPX05 (5'-CCTTTCCCTC-3');
- OPX06 (5'-ACGCCAGAGG-3');
- OPX07 (5'-GAGCGAGGCT-3');
- OPX08 (5'-CAGGGGTGGA-3');
- OPX11 (5'-GGAGCCTCAG-3');
- OPX13 (5'-ACGGGAGCAA-3');
- OPX17 (5'-GACACGGACC-3');
- OPX18 (5'-GACTAGGTGG-3');
- OPX19 (5'-TGGCAAGGCA-3');
- OPX20 (5'-CCCAGCTAGA-3');
- OPW03 (5'-GTCCGGAGTG-3');
- OPW04 (5'-CAGAAGCGGA-3');
- OPW06 (5'-AGGCCCGATG-3');
- OPW09 (5'-GTGACCGAGT-3');
- OPW13 (5'-CACAGCGACA-3');
- OPW17 (5'-GTCCTGGGTT-3');
- OPW19 (5'-CAAAGCGCTC-3').

As Figuras 13 a, b e c mostram os perfis de bandas obtidos através da amplificação com cada um dos iniciadores citados acima. Para a amplificação com os iniciadores OPX05, OPE09, OPX11, OPX04, OPW09, OPW17 e OPW04, OPX07, OPA06 e OPW03 (Figura 13a) foram utilizados três exemplares, sendo um de cada localidade estudada inicialmente, ou seja, Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC). Para os iniciadores OPA01, OPA07, OPW06, OPW13, OPW19,

OPX06, OPX18, OPX19, OPK04 e OPK14 (Figura 13b) foram utilizados quatro exemplares sendo um de Pontal do Sul (PR), um de Laranjeiras (PR) e dois de Lagoa da Conceição (SC). O objetivo de ter sido utilizado um exemplar a mais da localidade de Lagoa da Conceição (SC) neste segundo teste foi para verificar se a presença de RNA no DNA extraído interferiria na reação de PCR. Observou-se através do resultado que a presença de RNA não interfere no produto de amplificação. Este resultado foi de fundamental importância, visto que no método de extração de DNA utilizado em nosso trabalho, mesmo com o uso de RNase, verificou-se que ocorria presença de RNA. Através deste resultado, prosseguimos com as reações de PCR mesmo na presença de RNA constatando que a amplificação do DNA ocorria normalmente.

A Figura 13 c apresenta o padrão de bandas obtido com os iniciadores OPX08, OPX13, OPX17, OPX18 e OPX20. Foram usados novamente exemplares das três localidades iniciais, ou seja, Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC).

Dos 24 iniciadores testados, foram escolhidos para o presente trabalho 12 que estão relacionados a seguir com base na repetibilidade apresentada, padrão nítido de bandas e presença de bandas polimórficas.

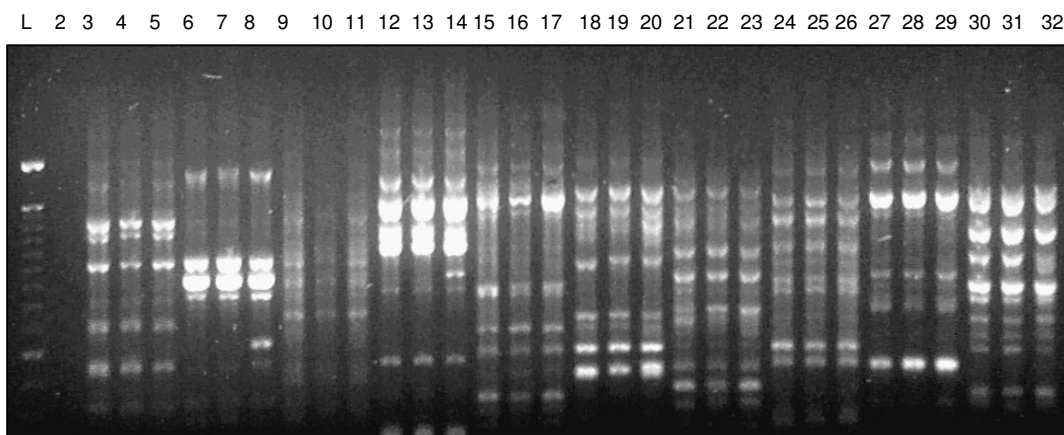
- OPW03, OPW04, OPW06, OPW09, OPW17, OPX04, OPX07, OPX17, OPX20, OPA06, OPE09 e OPK14.

O termociclador da marca TECHNE foi programado segundo as condições propostas por ALMEIDA (1998), com uma etapa inicial de 4min a 92° C, seguidos de 40 ciclos de 1min a 92° C, 1min30 a 40° C e 2min a 72° C. A etapa final consta de: 72° C por 5min seguido de resfriamento a 20° C por 20min e 4° C por 30min. Um controle negativo (com ausência de DNA) foi realizado em cada grupo de amplificações. Devido a problemas de ordem técnica, foi necessária a substituição do termociclador TECHNE por outro da marca EPPENDORF. Como tanto as condições de PCR quanto a programação do novo equipamento não sofreram alteração, foram obtidos os mesmos padrões de bandas para os diferentes iniciadores utilizados.

O preparo do tampão e do gel para a corrida eletroforética, a diluição do iniciador e a concentração dos reagentes na PCR para um volume de 13 µL estão disponíveis no Apêndice 1 no final do trabalho.

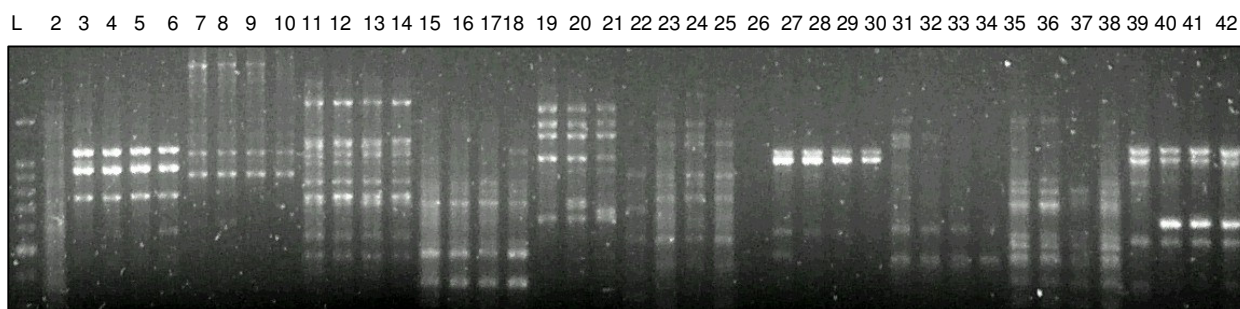
FIGURA 13 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD EM GEL DE AGAROSE 1,4% EM EXEMPLARES DE *Atherinella brasiliensis* PARA TESTE DOS INICIADORES

a)



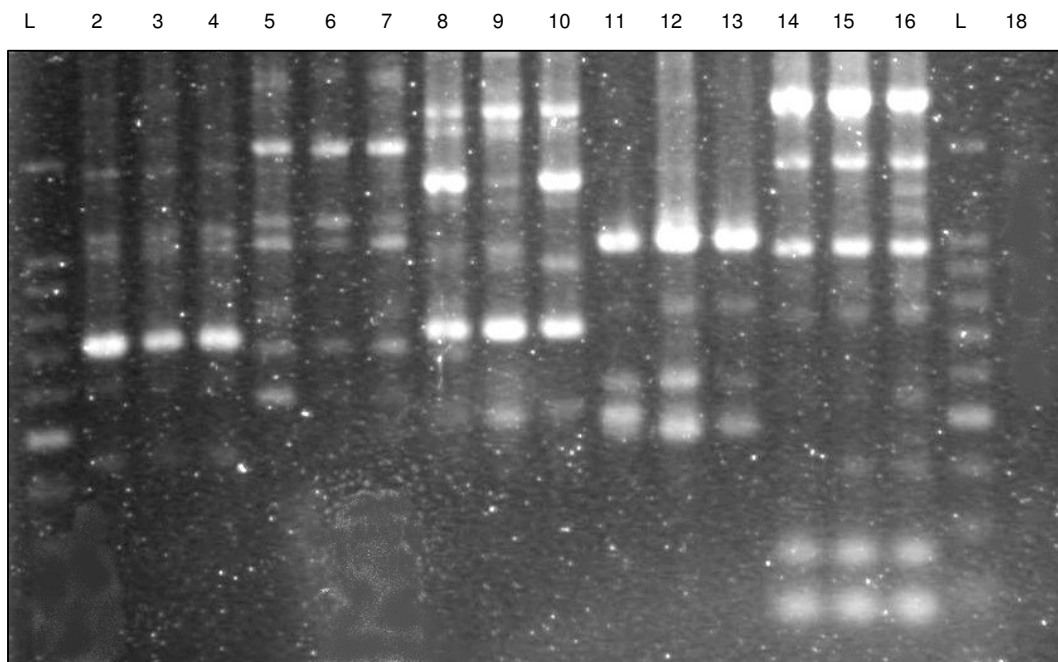
NOTA: Marcador de peso molecular de 100 pb (1ª banda com 2072 pb e 2ª com 1500 pb variando a seguir de 100 em 100) representado à esquerda do gel. Controle negativo na 2ª coluna. Amplificação realizada em três exemplares sendo o primeiro de Pontal o Sul (PR), o segundo de Laranjeiras (PR) e o terceiro de Lagoa da Conceição (SC). A seqüência dos iniciadores testados, da esquerda para a direita: OPX05, OPE09, OPX11, OPX04, OPW09, OPW17, OPW04, OPX07, OPA06 e OPW03.

b)



NOTA: Marcador de peso molecular de 100 pb (1ª banda com 1434 pb e 2ª com 1000 pb variando a seguir de 100 em 100) representado à esquerda do gel. Controle negativo na 2ª coluna. Amplificação realizada em quatro exemplares sendo o primeiro de Pontal o Sul (PR), o segundo de Laranjeiras (PR) e os dois últimos de Lagoa da Conceição (SC). A seqüência dos iniciadores testados, da esquerda para a direita: OPA01, OPA07, OPW06, OPW013, OPW019, OPX06, OPX18, OPX19, OPK04 e OPK014.

c)



NOTA: Marcador de peso molecular de 100 pb (1ª banda com 1434 pb e 2ª com 1000 pb variando a seguir de 100 em 100) representado na 1ª e 17ª coluna. Controle negativo após o ladder (18ª coluna). Amplificação realizada em três exemplares sendo o primeiro de Pontal o Sul (PR), o segundo de Laranjeiras (PR) e o último de Lagoa da Conceição (SC). A seqüência dos iniciadores testados, da esquerda para a direita: OPX08, OPX13, OPX17, OPX18 e OPX20.

3.2.4 Análise Eletroforética de RAPD

Os produtos de amplificação (13 μ L) acrescidos de 3 μ L do corante azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, submerso em tampão TBE (1X), durante 4h a uma voltagem de 60 V. Após, foram corados com brometo de etídeo (0,05%) durante 20min e visualizados sob luz ultravioleta. O gel foi então fotografado pela câmera *Olympus* modelo C-3040Zoom e a imagem capturada através do programa Shortcut-to-digiDoc-it. Foi utilizado o aplicativo Corel Photo-Paint 9 para a análise e comparação dos fragmentos amplificados. O tamanho dos fragmentos pode ser determinado comparando-se à distância migrada pelos mesmos com as bandas de um marcador padrão (Ladder de 100 pb, PB-L produtos Bio-Lógicos).

Os produtos amplificados pelos iniciadores na espécie *Atherinella brasiliensis* foram selecionados a partir de padrões de intensidade, reprodutibilidade e maior número de bandas polimórficas. Os padrões de RAPD foram comparados dentro (diferenças interindividuais) e entre os locais de coleta (diferenças interpopulacionais).

3.2.5 Análises Estatísticas

A partir da observação das imagens dos géis de RAPD, avaliou-se o padrão de bandas gerado, ao qual foi atribuído o valor de 1 ou 0 para a presença ou ausência do fragmento, respectivamente. Para tal, assumiu-se que alelos de diferentes locus não migram para a mesma posição no gel e que cada banda representa um loco Mendeliano com características dominantes e em equilíbrio, com um alelo nulo recessivo não visível (LYNCH; MILLIGAN, 1994). Assim, com a utilização do programa NTSYS versão 2.1 (*Numerical and Multivariate Analysis System*; ROHLF, 2000) foram contruídas matrizes de similaridade, adotando-se o coeficiente de JACCARD (1901) como a seguir: $J=a/(a+b+c)$, onde a corresponde ao número de concordâncias positivas entre dois indivíduos x e y; b ao número total de características únicas presentes no indivíduo x e c ao total de características únicas no indivíduo y. A partir da matriz de similaridade genética dois Gráficos de Coordenadas Principais (PCO) foram gerados (bi e tri dimensionais) para verificar a dispersão dos indivíduos das localidades amostradas.

Através do mesmo programa, realizou-se a correlação cofenética para comparar as duas matrizes simétricas e análises de agrupamento foram realizadas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*) (SNEATH; SOKAL, 1973). Valores de bootstrap foram obtidos com o uso do programa BOOD versão 3.03 (COELHO, 2004).

O Teste de MANTEL (1967) foi utilizado por meio do programa MANTEL STRUCT 1.0 (MILLER, 1999) para avaliar a diferenciação genética entre as populações de *Atherinella brasiliensis* através da comparação entre a matriz de similaridade e uma matriz modelo que expressa as origens dos indivíduos.

Uma matriz euclideana de distância genética foi usada para gerar uma AMOVA (Análise de Variância Molecular) segundo EXCOFFIER et al. (1992) a partir do software ARLEQUIN versão 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) a fim de estimar a estruturação genética entre as localidades analisadas. Esta análise fornece os valores de θ_{ST} , análogo ao F_{ST} de WRIGHT (1978), o qual representa uma medida do grau de diferenciação genética ou de subdivisão interpopulacional (SLATKIN, 1993). Segundo WRIGHT (1978), valores entre 0 e 0,05 indicam pouca diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 indicam uma diferenciação moderada,

entre 0,15 e 0,25, uma alta diferenciação e valores acima de 0,25 representariam uma diferenciação genética muito alta.

4 RESULTADOS

Através dos 12 iniciadores escolhidos realizou-se dois tipos de análises:

1) Para o agrupamento entre os indivíduos das sete diferentes localidades empregou-se o método UPGMA sendo que a espécie *Odontesthes argentinensis* foi utilizada como grupo externo. A *Atherinella brasiliensis* é a única representante do seu gênero no Oceano Atlântico (DYER, 2006), sendo assim, o *O. argentinensis* foi a espécie mais próxima possível de ser coletada na costa brasileira. Com o auxílio do programa NTSYS 2.1, Gráficos de Coordenadas Principais (bi e tridimensionais) foram gerados através da matriz de similaridade de JACCARD para verificar a dispersão dos indivíduos das diferentes regiões. O objetivo de ter sido usado um grupo externo foi o de avaliar se os exemplares das diferentes localidades amostradas pertenciam a uma mesma espécie. Nesta etapa obteve-se 183 bandas sendo 78 exclusivas de *Odontesthes argentinensis*, 81 de *Atherinella brasiliensis* e 24 comuns às duas espécies (Tabela 2).

2) Para gerar a AMOVA e realizar o Teste de MANTEL utilizou-se 105 bandas pertencentes à espécie *Atherinella brasiliensis* (87 polimórficas e 24 monomórficas; Tabela 2). Como os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) apresentaram uma diferenciação genética muito alta em relação aos indivíduos das demais regiões amostradas, dois diferentes tipos de Gráficos de Coordenadas Principais foram gerados: com e sem a presença dos mesmos. A finalidade foi verificar de uma forma mais clara a dispersão dos exemplares das demais localidades.

A relação dos 12 iniciadores selecionados e as respectivas bandas geradas estão representados na Tabela 2. O perfil de bandas obtido através da amplificação com o iniciador OPX07 foi o escolhido para apresentação neste trabalho devido à presença de um considerável número de fragmentos com eficiente nitidez e reprodutibilidade (Figura 14). A ordem em que os exemplares foram amostrados nos géis de agarose não foi aleatória, sendo disponibilizados de acordo com um esquema que propiciasse a análise comparativa intra e interpopulacional sendo repetido para os demais iniciadores.

Da Figura 15 a 21 estão representados os perfis eletroforéticos de RAPD obtidos através da amplificação com os iniciadores OPW03, OPW04, OPW06,

OPW09, OPX17, OPE09 e OPK14. Na composição desses géis, foram utilizados quatro exemplares de cada uma das sete localidades estudadas e três exemplares do grupo externo com o propósito de comparar os padrões de bandas dos indivíduos de cada local num mesmo gel, bem como avaliar a repetibilidade das mesmas.

TABELA 2 – TAMANHO APROXIMADO (PB) DOS FRAGMENTOS DE DNA GERADOS A PARTIR DA REAÇÃO DE RAPD EM *Odontesthes argentinensis* E *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES A PARTIR DE 12 INICIADORES

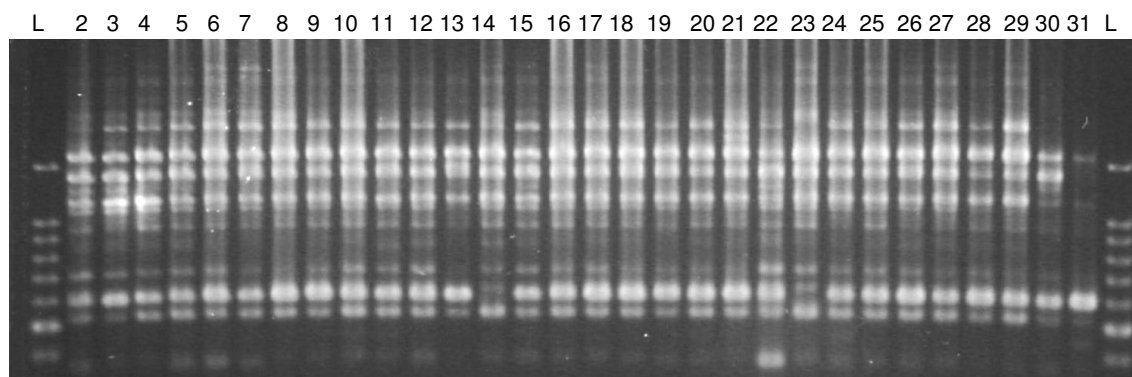
Bandas ~pb																						
Iniciador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
OPW03	1700*	1550**	1500**	1400*	1230**	1200**	1100*	1000**	850	730**	650*	350*										
OPW04	1400*	1350*	1200*	1100	1000*	830**	800*	750**	700**	650*	450**	420*	380*	280**								
OPW06	1650**	1400*	1250**	1200**	1150	1100	980**	950*	900*	830**	800*	750**	600*	550**	530**	450**	400*	350*	300*			
OPW09	1800*	1700**	1600**	1530*	1500**	1300*	1250*	1150	1050**	1000*	880**	800*	750**	700*	680**	600*	500*	420	380*	200		
OPW17	1600**	1550*	1300	1080*	1050**	1000*	750*	720**	620**	580**	500**	450*										
OPX04	2000**	1650*	1600**	1550**	1500**	1400*	1380**	1280*	1250**	1200*	1180**	1000	950*	900*	850	800*	750**	700*	680*	450**	400	320**
OPX07	1500**	1434**	1350**	1200**	1150**	1100**	1000*	950**	900**	820*	700**	620	600**	580*	520	480*	400*					
OPX17	1600**	1580*	1550*	1350*	1300	1200*	1150*	1100*	1080*	1000**	950**	850*	800	750**	700	600**	530**					
OPX20	1800*	1500*	1400*	1250**	1150*	1100**	950*	850**	800*	720**	700*	580	370**	350*	280**	190**						
OPA06	1800	1450	1400	900**	800*	750**	700*	650**	580**	530**	500*	400**										
OPE09	1100**	950**	800**	710	650**	580*	480*	320*														
OPK14	1550*	1400	1300**	1200**	1100**	980	900*	850**	780*	720*	650	550**	520*	500*								

Nota: *: bandas exclusivas de *Odontesthes argentinensis*

** : bandas exclusivas de *Atherinella brasiliensis*

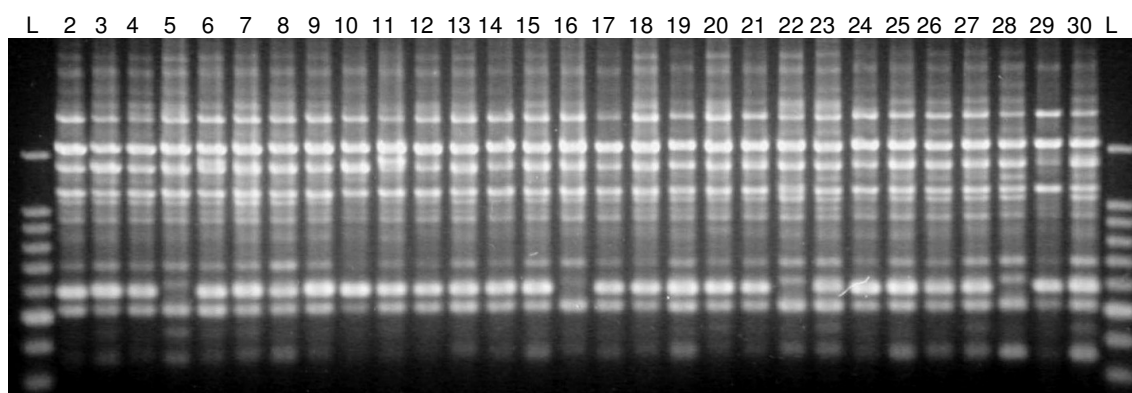
FIGURA 14 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS E *Odontesthes argentinensis* (GRUPO EXTERNO) OBTIDO ATRAVÉS DO INICIADOR OPX07

a)



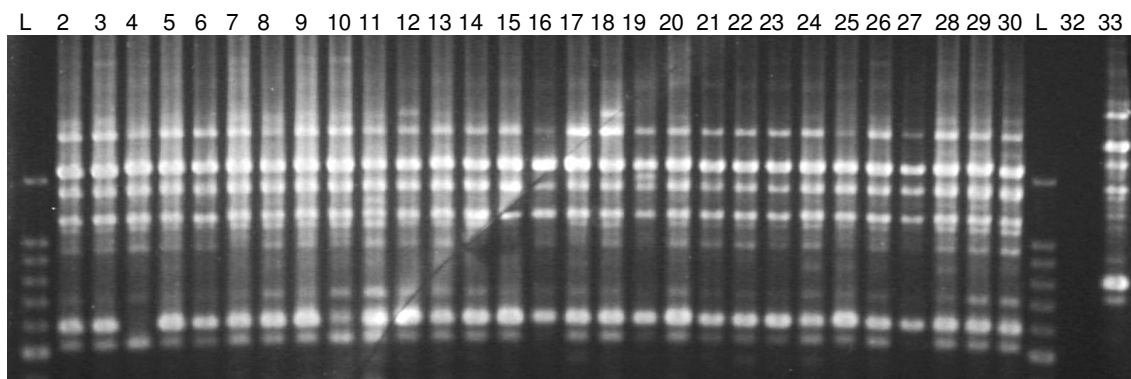
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 21 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR) e da coluna 22 a 31 os exemplares de Laranjeiras.

b)



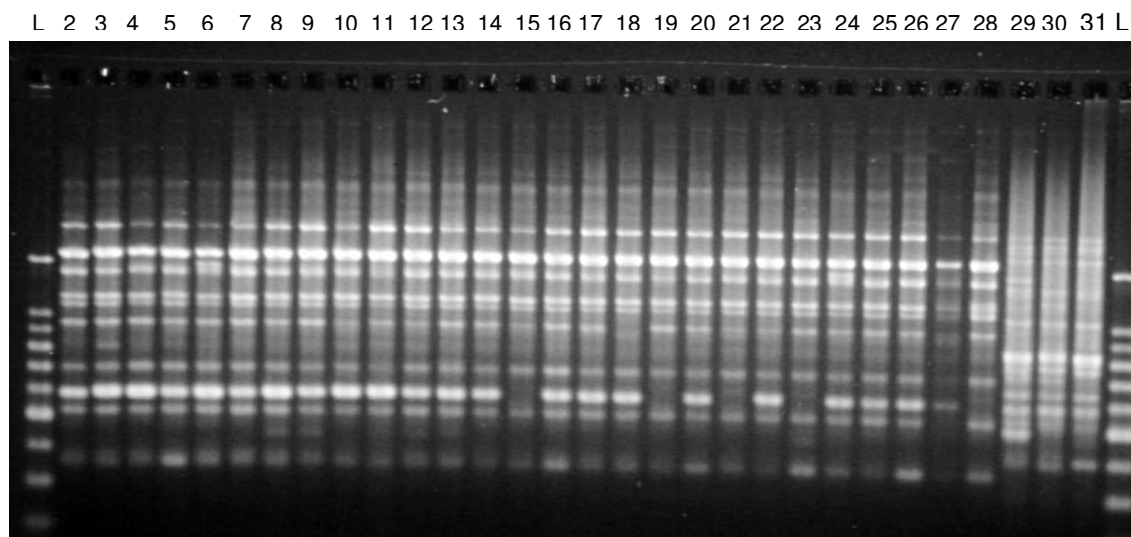
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 11 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da coluna 12 a 20 os exemplares de Laranjeiras e da 21 a 30 os de da Lagoa da Conceição (SC).

c)



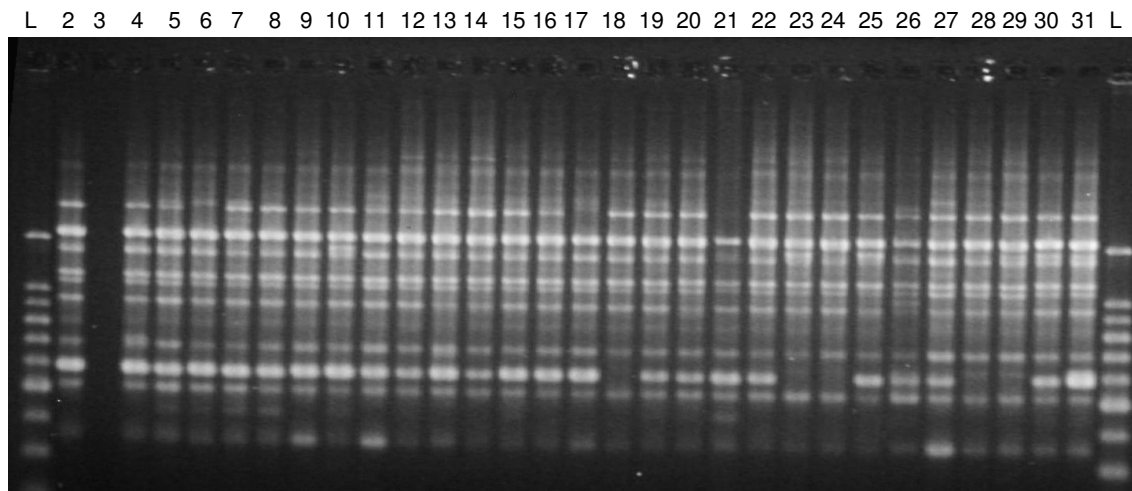
NOTA: A primeira e a 31ª coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 11 estão representados os exemplares da localidade de Laranjeiras, da 12 a 30 mais a 33 estão os da Lagoa da Conceição (SC) e a coluna 32 contém o controle negativo.

d)



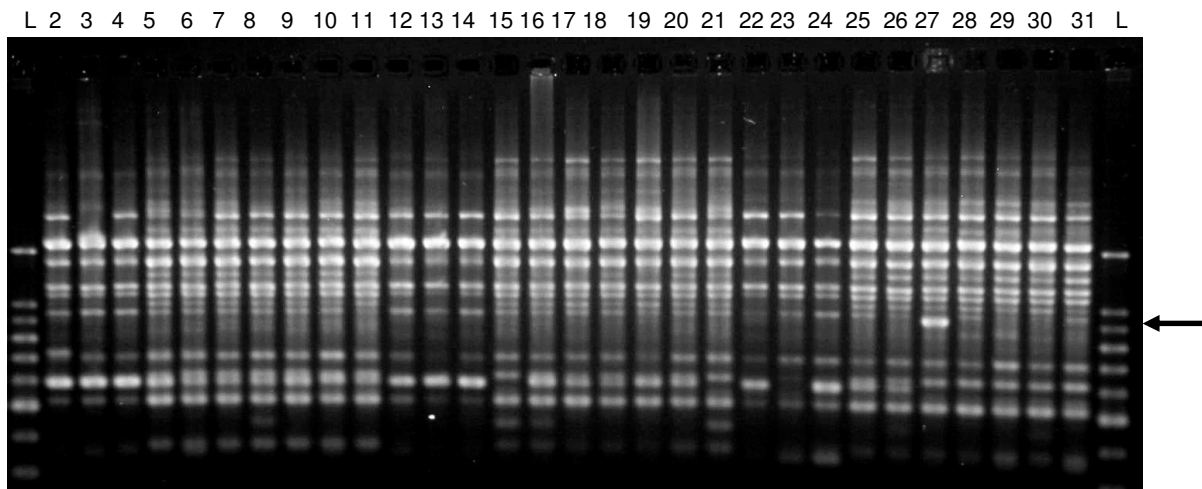
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 8 estão representados os exemplares da localidade de Lagoa do Camacho (SC), da coluna 9 a 15 os de Lagoa do Patos (RS), da coluna 16 a 22 os de Lagoa de Carapebus (RJ), da 23 a 24 de Pontal do Sul (PR), da 25 a 26 de Laranjeiras (PR), da 27 a 28, de Lagoa da Conceição e da 29 a 31 os *Odontesthes argentinensis* (grupo externo).

e)



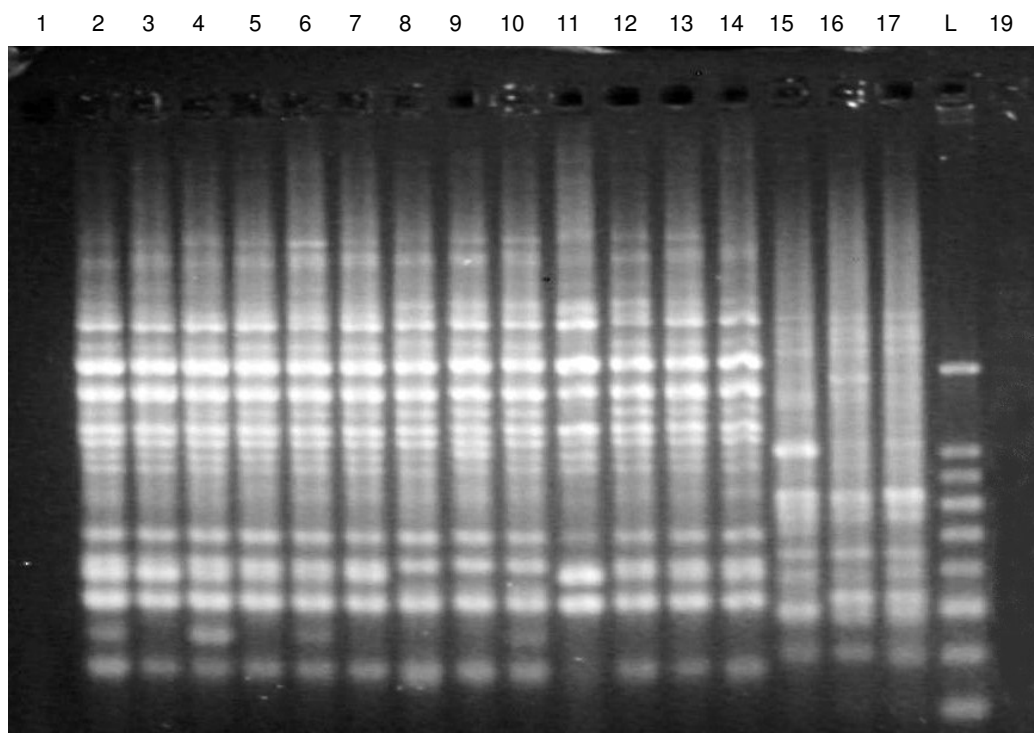
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 11 estão representados os exemplares da localidade da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 12 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS) e da 22 a 31 os de Lagoa de Carapebus (RJ).

f)



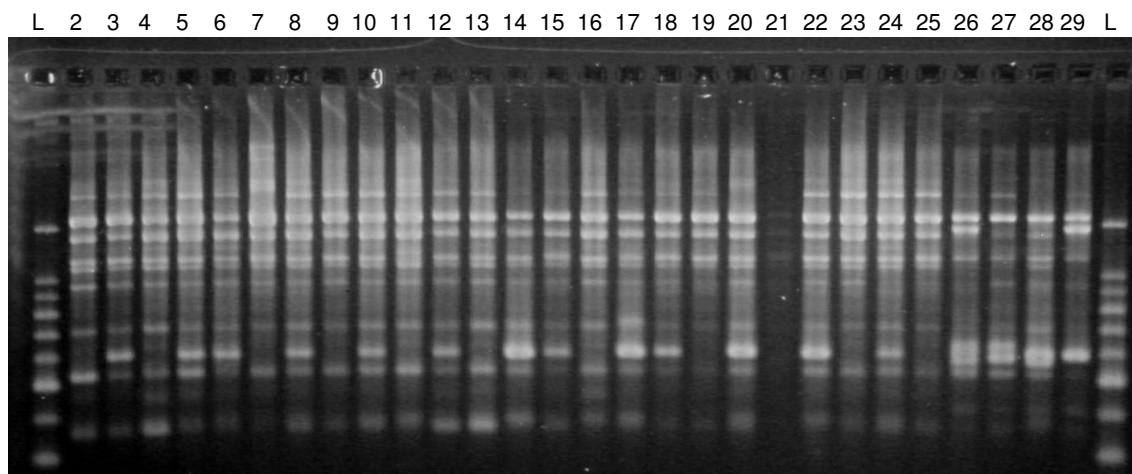
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 11 estão representados os exemplares da localidade da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 12 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS) e da 22 a 31 os de Lagoa de Carapebus (RJ). A seta indica o fragmento de aproximadamente 900 pb encontrado em um exemplar somente (de Lagoa de Carapebus - RJ) dentre os 210 analisados.

g)



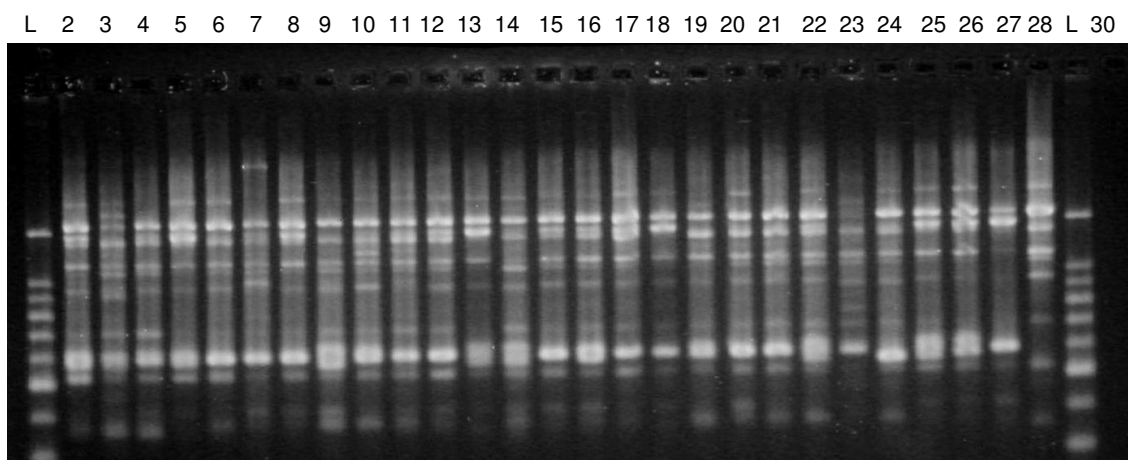
NOTA: A última coluna contém os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 4 estão representados os exemplares da localidade da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 5 a 7 os de Lagoa dos Patos (RS), da 8 a 10 os de Lagoa de Carapebus (RJ), na 11 um exemplar de Laranjeiras (PR), 12 de Pontal do Sul, 13 de Laranjeiras, 14 de Lagoa da Conceição e da 15 a 17 os *Odontesthes argentinensis* (grupo externo). Controle negativo na 19ª coluna.

h)



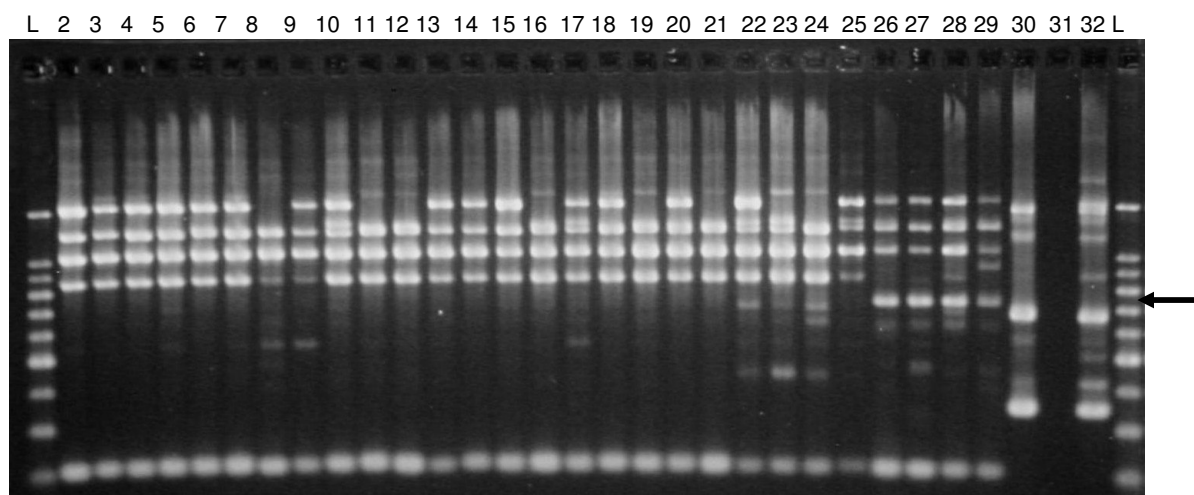
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA).

i)



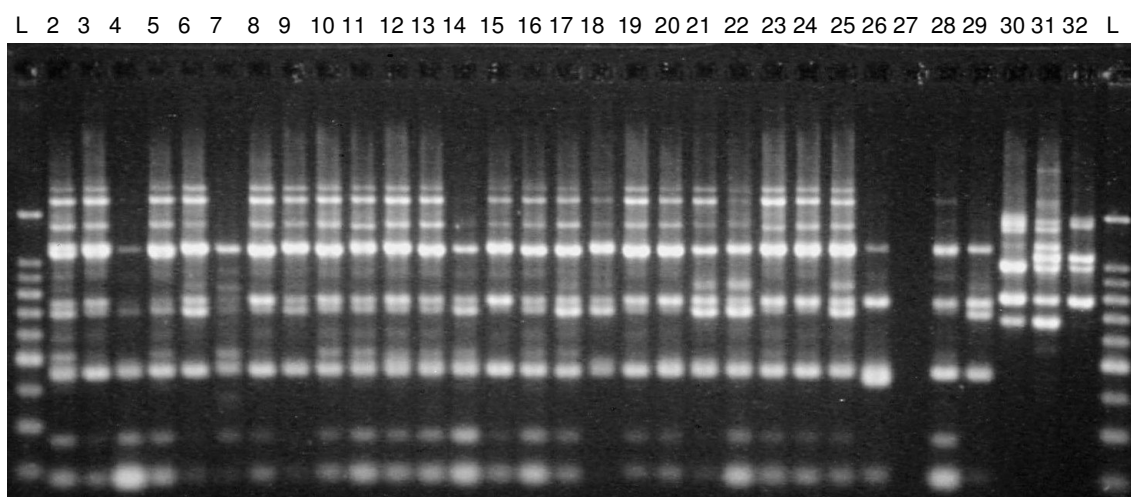
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 28 estão representados os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA). Controle negativo na 30ª coluna.

FIGURA 15 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW03



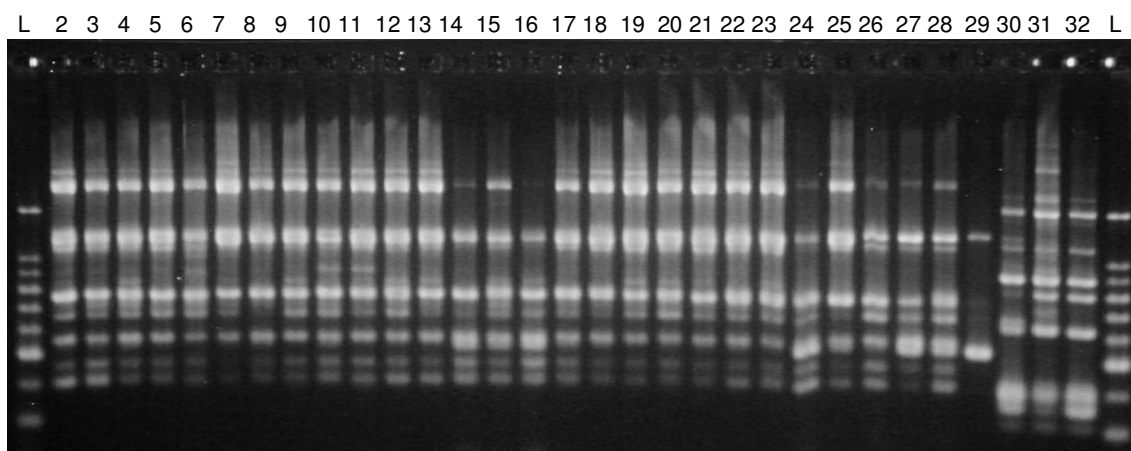
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*). A seta indica o fragmento de aproximadamente 730 pb que ocorreu em 100% dos exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA), em 30% dos exemplares das localidades de Pontal do Sul (PR), Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC), em 3,3% dos de Lagoa de Carapebus (RJ), estando ausente nos da Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa dos Patos (RS).

FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW04



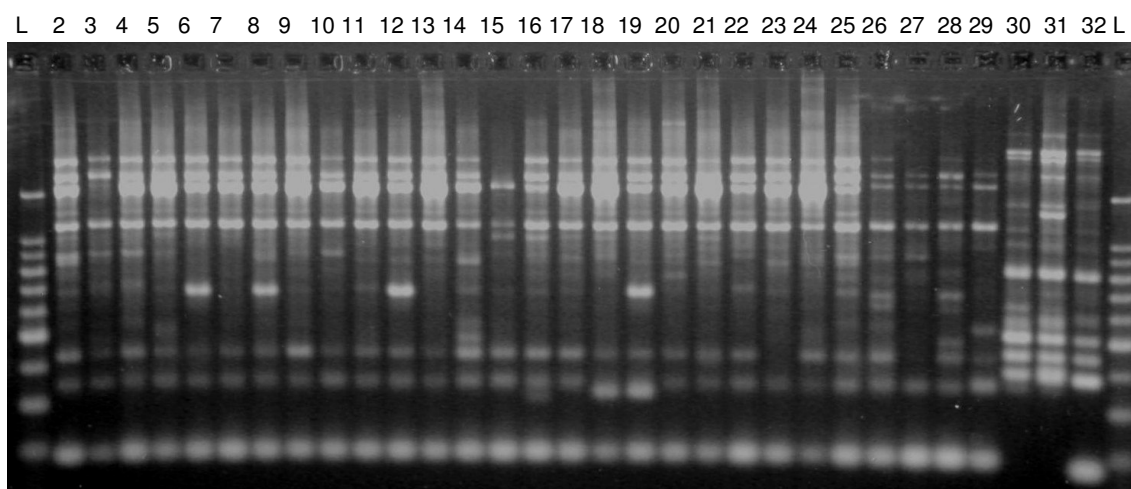
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*).

FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW06



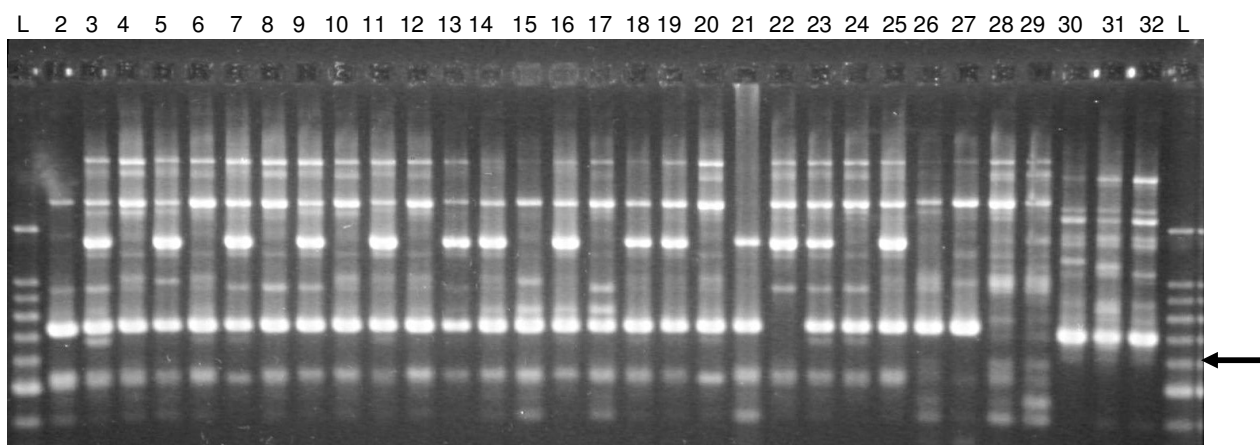
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*).

FIGURA 18 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPW09



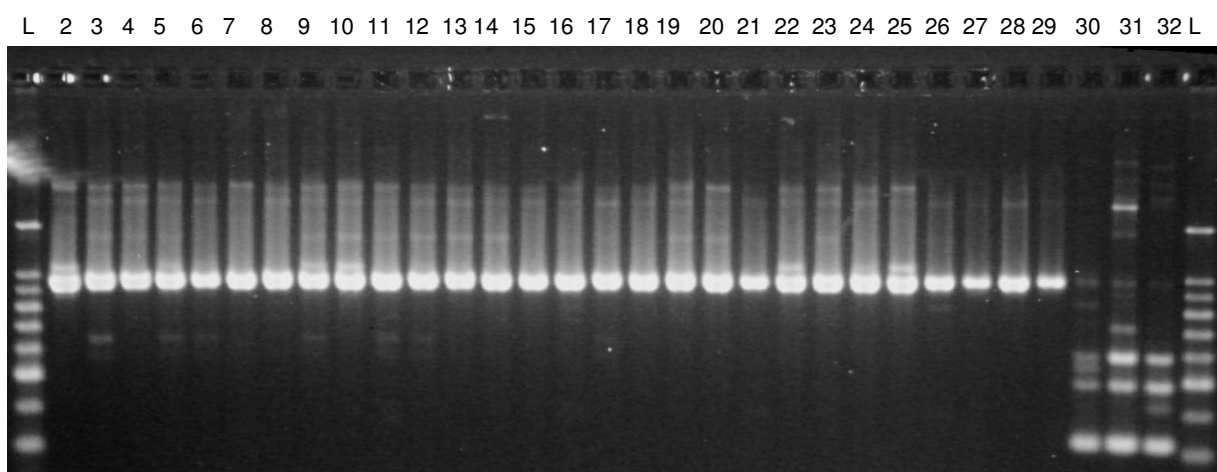
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*).

FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPX17



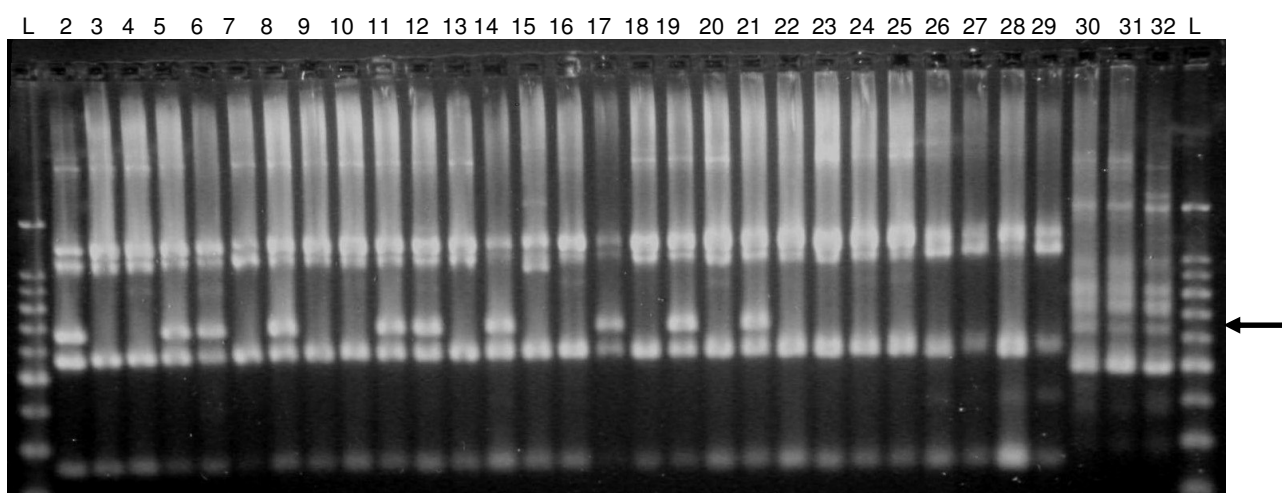
NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*). A seta indica o fragmento de aproximadamente 600 pb que ocorreu exclusivamente nos exemplares de Barra Grande de Camamu (BA).

FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPE09



NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus (RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*).

FIGURA 21 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DE SETE DIFERENTES LOCALIDADES E *Odontesthes argentinensis* OBTIDOS ATRAVÉS DO INICIADOR OPK14



NOTA: A primeira e a última coluna contêm os fragmentos marcadores de peso molecular (*Ladder* de 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos) tendo uma primeira banda adicional de 1434 pb. Da coluna 2 a 5 estão representados os exemplares da localidade de Pontal do Sul (PR), da 6 a 9 os de Laranjeiras (SC), da 10 a 13 os de Lagoa da Conceição (SC), da 14 a 17 os da Lagoa do Camacho (SC), da coluna 18 a 21 os de Lagoa dos Patos (RS), da 22 a 25 da Lagoa de Carapebus(RJ), da 26 a 29 os da Barra Grande de Camamu (BA) e da 30 a 32 o grupo externo (*Odontesthes argentinensis*). A seta indica o fragmento de aproximadamente 650 pb que esteve presente nos exemplares de todas as localidades (em diferentes proporções) com exceção dos da Lagoa de Carapebus (RJ).

A variação de frequências de algumas bandas de *Atherinella brasiliensis* foi significativa entre as localidades amostradas, principalmente para os indivíduos da Barra Grande de Camamu (BA) (Tabela 3). Bandas específicas foram visualizadas em exemplares de diferentes localidades sendo consideradas como marcadores diagnósticos úteis. A banda gerada pelo iniciador OPW03 (Figura 15 – vide seta) de aproximadamente 730 pb ocorreu em 100% dos exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (Tabela 3) estando ausente nos indivíduos da Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa dos Patos (RS). O fragmento gerado pelo iniciador OPX17 (Figura 19 – vide seta), com tamanho aproximado de 600 pb só ocorreu nos exemplares da Bahia (Tabela 3) enquanto a banda de aproximadamente 650 pb gerada pelo iniciador OPK14 (Figura 21- vide seta) esteve presente em todas as localidades com exceção dos exemplares da Lagoa de Carapebus (RJ) (Tabela 3). Determinados fragmentos como o gerado através da amplificação com o iniciador OPX07 foi identificado em somente um ou dois indivíduos de uma dada localidade e foram determinantes para o diagnóstico da diversidade genética intrapopulacional (Tabela 3 e seta na Figura 14f - aproximadamente 900 pb).

Para a análise de agrupamento UPGMA, as bandas de RAPD das espécies *A. brasiliensis* e *O. argentinensis* foram utilizadas para a construção de um Dendrograma de similaridade genética (Apêndice 2). A correlação entre as matrizes (correlação cofenética=0,97) foi estatisticamente alta demonstrando ocorrer uma correspondência entre as matrizes geradas a partir do Dendrograma e a obtida pelos dados fornecidos. As análises de *bootstrap* não apoiaram as maiores ramificações que apresentaram baixos valores evitando desta forma qualquer conclusão consistente sobre quais delas reúnem um grande número de indivíduos. Entretanto, foi observada a formação de dois grupos maiores, ou seja, dos exemplares de Barra Grande de Camamu (BA) e dos *O. argentinensis* (grupo externo). Por meio dos resultados obtidos, pode-se inferir que o Dendrograma gerado não foi a melhor representação do padrão de divergência genética entre os exemplares das localidades analisadas, não sendo portanto, apresentado no corpo principal do trabalho. Foram fornecidos no Dendrograma os valores de *bootstrap* acima de 40,0.

Desta maneira, o Gráfico de Coordenadas Principais (PCO) baseado na similaridade de JACCARD foi a melhor indicação da diversidade genética entre os indivíduos das regiões amostradas. Para esta análise três gráficos foram gerados:

- 1) PCO incluindo o grupo externo com a finalidade de avaliar se os exemplares das sete localidades analisadas pertenciam à mesma espécie (Figura 22);
- 2) PCO com os indivíduos das sete regiões analisadas a fim de avaliar a distribuição da diferenciação genética (Figura 23);
- 3) PCO excluindo os indivíduos da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) visto que foi encontrada uma alta divergência entre os mesmos e as demais regiões analisadas interferindo na verificação de como estas estavam se distribuindo realmente (Figura 24).

Devido ao fato de não terem sido obtidos valores expressivos nos eixos X e Y dos PCOs bidimensionais foram apresentados no trabalho os resultados dos PCOs tridimensionais. Esta medida teve como objetivo confirmar os dados encontrados anteriormente da distribuição da diversidade genética entre os indivíduos das localidades estudadas (Apêndice 3) assegurando desta maneira, a confiabilidade dos resultados. Os dados foram ratificados, apesar dos valores referentes aos eixos das abcissas e ordenadas terem sido igualmente baixos. Porém, devido ao fato destes dados terem sido corroborados pelo Teste de MANTEL (Tabela 4) e pela AMOVA (Tabela 5) podemos considerá-los confiáveis.

Os resultados referentes ao Teste de MANTEL estão representados na Tabela 4 e fornecem o grau de diferenciação entre os exemplares das diferentes regiões. Os valores deste teste variam entre -1 e +1 e como se pode observar através dos dados obtidos os indivíduos dos diferentes locais analisados apresentam uma correlação positiva. A diferenciação genética encontrada entre os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) e as demais foi alta (acima de 0,50) considerando-se que todos os indivíduos analisados pertencem a uma mesma espécie. Os valores de p foram altamente significativos para todas as localidades com exceção aqueles referentes às localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) cujo valor foi de 0,1082. Este valor não significativo foi encontrado também na AMOVA para as mesmas regiões.

Os dados obtidos através da Análise de Variância dos Marcadores Moleculares (AMOVA) estão representados na Tabela 5 e variam de 0 a 1. A interpretação dos valores de F_{ST} , G_{ST} ou θ_{ST} é semelhante: valores não significativos indicam que a hipótese nula da panmixia não pode ser rejeitada e indicam a necessidade de outros estudos para verificação da homogeneidade. Para

estimativas significativamente diferentes de zero, valores entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação, valores entre 0,05 e 0,25 indicam estruturação moderada e acima de 0,25 indicam uma alta estruturação populacional (WRIGHT, 1978). Como relatado anteriormente, os valores de p foram altamente significativos com exceção das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) cujo resultado foi de 0,08992. Desta forma, pode-se relacionar os valores encontrados na AMOVA com os fornecidos pelo Teste de MANTEL e sugere-se a existência de quatro populações distintas:

POPULAÇÃO 1: formada pelas localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e pela localidade de Lagoa da Conceição (SC);

POPULAÇÃO 2: formada pelas localidades de Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa dos Patos (RS);

POPULAÇÃO 3: formada pela localidade de Lagoa de Carapebus (RJ);

POPULAÇÃO 4: formada pela localidade de Barra Grande de Camamu (BA).

Estes resultados foram corroborados principalmente pelos Gráficos de Coordenadas Principais bidimensionais (Figuras 23 e 24), pelos Gráficos de Coordenadas Principais tridimensionais (Apêndice 3) e pelo Dendrograma (Apêndice 2).

Quanto aos tipos de análises realizadas neste trabalho algumas inferências devem ser feitas. Os Gráficos de Coordenadas Principais bi e tridimensionais obtidos a partir da matriz de similaridade de JACCARD por meio do programa NTSYS 2.1 forneceram melhores resultados a respeito do agrupamento entre os exemplares das diferentes localidades do que o Dendrograma. Para as análises de diferenciação e estruturação genética, tanto o programa ARLEQUIN versão 2000 para gerar a AMOVA quanto o MANTEL STRUCT 1.0 para realizar o Teste de MANTEL forneceram resultados satisfatórios. Porém, devido à facilidade de realização dos testes, o programa MANTEL STRUCT 1.0 deve ser utilizado em detrimento do ARLEQUIN 2000.

TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE ALGUMAS BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS GERADAS A PARTIR DA AMPLIFICAÇÃO COM OS 12 INICIADORES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

(continua)

Iniciador/Localidade	Pontal do Sul (PR)	Laranjeiras (PR)	Lagoa da Conceição (SC)	Lagoa do Camacho (SC)	Lagoa dos Patos (RS)	Lagoa de Carapebus (RJ)	Barra Grande de Camamu (BA)
Primer OPW03							
a) ~730 pb	26,6%	30%	23,3%	0%	0%	3,3%	100%
Primer OPW04							
a) ~830 pb	13,3%	16,6%	10%	16,6%	16,6%	20%	3,3%
Primer OPW06							
a) ~1650 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80%
b) ~1200 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
c) ~550 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	70%
Primer OPW09							
a) ~1700 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	70%
b) ~1050 pb	0%	3,3%	0%	3,3%	0%	0%	0%
Primer OPW17							
a) ~620 pb	70%	73,3%	36,6%	3,3%	23,3%	40%	10%
Primer OPX04							
a) ~1000 pb	0%	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%	6,6%	36,6%
b) ~400 pb	6,6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE ALGUMAS BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS GERADAS A PARTIR DA AMPLIFICAÇÃO COM OS 12 INICIADORES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

(continuação)

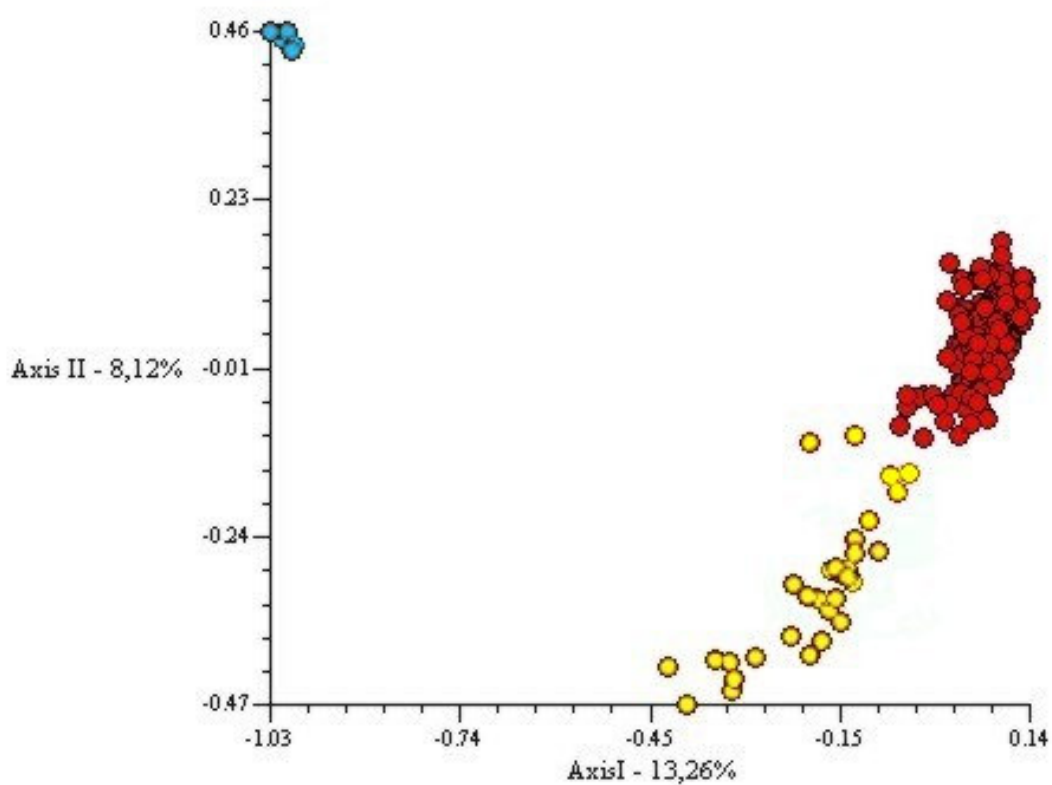
Iniciador/Localidade	Pontal do Sul (PR)	Laranjeiras (PR)	Lagoa da Conceição (SC)	Lagoa do Camacho (SC)	Lagoa dos Patos (RS)	Lagoa de Carapebus (RJ)	Barra Grande de Camamu (BA)
Primer OPX07							
a) ~1434 pb	10%	0%	3,3%	6,6%	0%	13,3%	53,3%
b) ~1350 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	76,6%
c) ~1150 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	93,3%
d) ~900 pb	0%	0%	0%	0%	0%	3,3%	0%
e) ~620 pb	6,6%	6,6%	6%	33,3%	30%	36,6%	60%
Primer OPX17							
a) ~1300 pb	93,3%	80%	83,3%	83,3%	86,6%	76,6%	16,6%
b) ~ 800 pb	16,6%	16%	26,6%	30%	6,6%	0%	10%
c) ~750 pb	100%	100%	100%	100%	100%	96,6%	43,3%
d) ~700 pb	40%	30%	16,6%	30%	36,6%	60%	6,6%
e) ~600 pb	0%	0%	0%	0%	0%	0%	30%
f) ~530 pb	100%	100%	100%	100%	100%	100%	53,3%
Primer OPX 20							
a) ~850 pb	0%	0%	3,3%	0%	0%	50%	0%
b) ~370 pb	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%

TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE ALGUMAS BANDAS DE RAPD DE *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS GERADAS A PARTIR DA AMPLIFICAÇÃO COM OS 12 INICIADORES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

(conclusão)

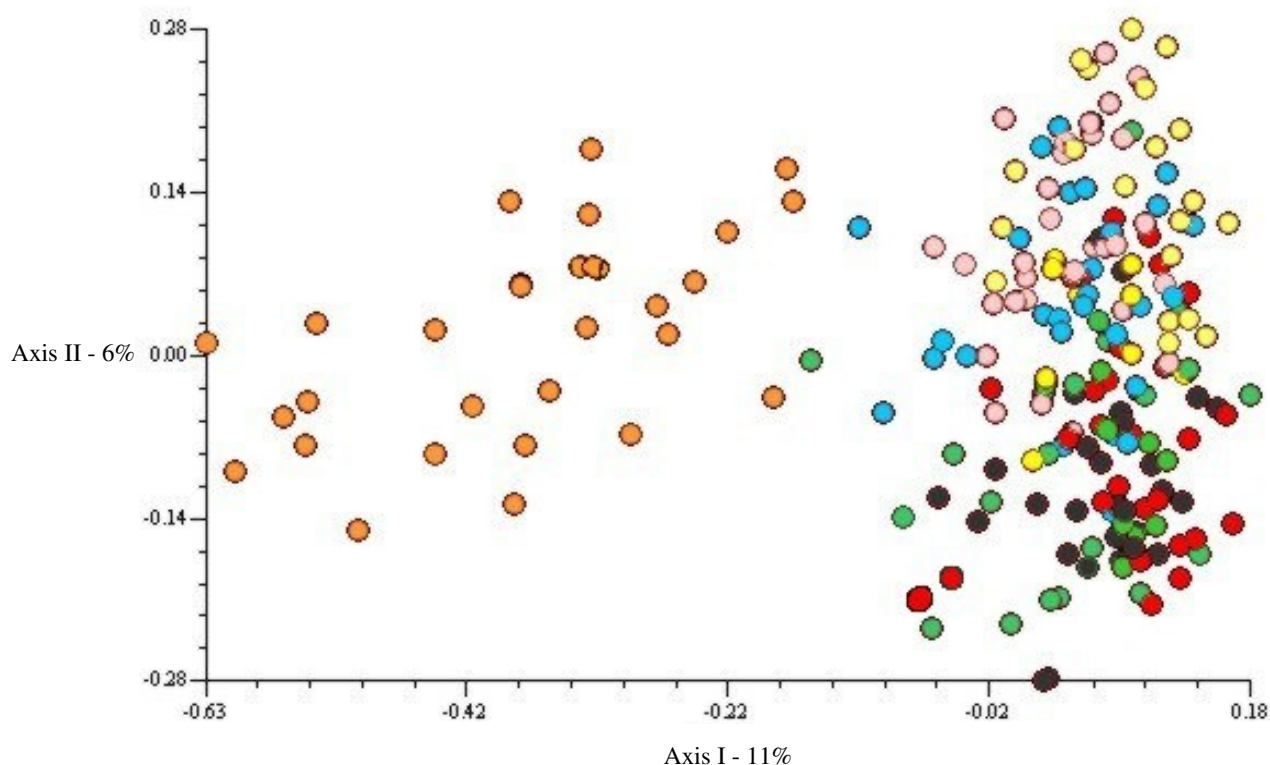
Iniciador/Localidade	Pontal do Sul (PR)	Laranjeiras (PR)	Lagoa da Conceição (SC)	Lagoa do Camacho (SC)	Lagoa dos Patos (RS)	Lagoa de Carapebus (RJ)	Barra Grande de Camamu (BA)
Primer OPA06							
a) ~650 pb	3,3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
b) ~580 pb	0%	0%	0%	0%	0%	6,6%	0%
c) ~400 pb	0%	0%	0%	3,3%	0%	0%	0%
Primer OPE09							
a) ~1100 pb	10%	13,3%	3,3%	3,3%	0%	53,3%	0%
b) ~800 pb	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10%
c) ~710 pb	0%	0%	0%	0%	0%	0%	6,6%
d) ~650 pb	33,3%	40%	13,3%	20%	10%	0%	3,3%
Primer OPK14							
a) ~980pb	0%	0%	0%	10%	0%	0%	0%
b) ~850 pb	3,3%	3,3%	10%	0%	0%	6,6%	10%
c) ~650 pb	43,3%	30%	46,6%	50%	83,3%	0%	3,3%

FIGURA 22 – GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA AS ESPÉCIES *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS E *Odontesthes argentinensis* (GRUPO EXTERNO)



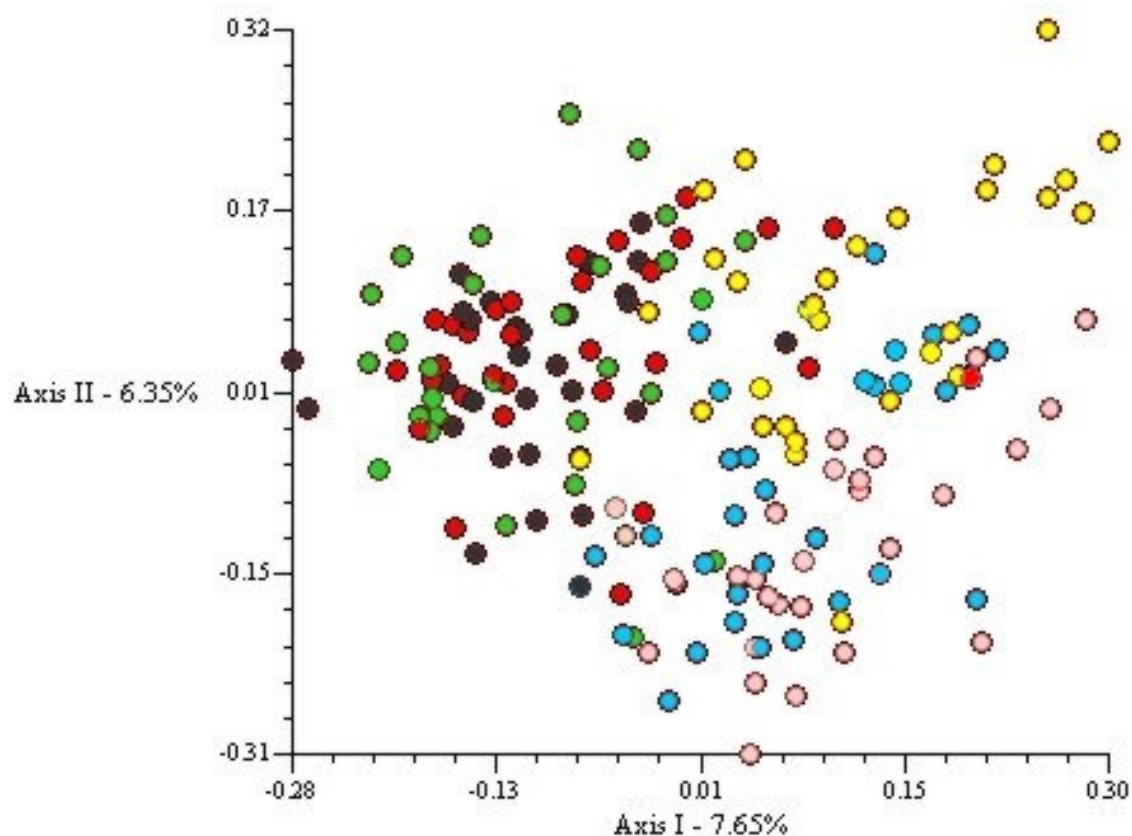
NOTA: Em azul estão representados os exemplares *Odontesthes argentinensis* (grupo externo), em amarelo os exemplares de *Atherinella brasiliensis* da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) e em vermelho os exemplares das demais localidades

FIGURA 23 – GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA A ESPÉCIE *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS



NOTA: Em laranja estão representados os exemplares de Barra Grande de Camamu (BA), em amarelo os de Lagoa de Carapebus (RJ), em azul os de Lagoa dos Patos (RS), em rosa os de Lagoa do Camacho (SC), em vermelho os de Lagoa da Conceição (SC), em verde os de Laranjeiras (PR) e em preto os de Pontal do Sul (PR)

FIGURA 24 – GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA A ESPÉCIE *Atherinella brasiliensis* DAS LOCALIDADES DE PONTAL DO SUL E LARANJEIRAS (PR), LAGOA DA CONCEIÇÃO E LAGOA DO CAMACHO (SC), LAGOA DOS PATOS (RS) E LAGOA DE CARAPEBUS (RJ)



NOTA: Em amarelo estão representados os exemplares de Lagoa de Carapebus (RJ), em azul os de Lagoa dos Patos (RS), em rosa os de Lagoa do Camacho (SC), em vermelho os de Lagoa da Conceição (SC), em verde os de Laranjeiras (PR) e em preto os de Pontal do Sul (PR)

TABELA 4 – TESTE DE MANTEL (1967) OBTIDO ATRAVÉS DE 10.000 PERMUTAÇÕES ALEATÓRIAS

Populações	r	p
Pontal do Sul (PR) x Laranjeiras (PR)	0,0177	0,1082 ^{ns}
Pontal do Sul (PR) x Lagoa da Conceição (PR)	0,1142	0,0001
Pontal do Sul (PR) x Lagoa do Camacho (SC)	0,3290	0,0001
Pontal do Sul (PR) x Lagoa dos Patos (RS)	0,2495	0,0001
Pontal do Sul (PR) x Lagoa de Carapebus (RJ)	0,3568	0,0001
Pontal do Sul (PR) x Barra Grande de Camamu (BA)	0,5162	0,0001
Laranjeiras (PR) x Lagoa da Conceição (SC)	0,0847	0,0002
Laranjeiras (PR) x Lagoa do Camacho (SC)	0,3128	0,0001
Laranjeiras (PR) x Lagoa dos Patos (RS)	0,2194	0,0001
Laranjeiras (PR) x Lagoa de Carapebus (RJ)	0,2883	0,0001
Laranjeiras (PR) x Barra Grande de Camamu (BA)	0,5187	0,0001
Lagoa da Conceição (SC) x Lagoa do Camacho (SC)	0,3519	0,0001
Lagoa da Conceição (SC) x Lagoa dos Patos (RS)	0,2433	0,0001
Lagoa da Conceição (SC) x Lagoa de Carapebus (RJ)	0,3479	0,0001
Lagoa da Conceição (SC) x Barra Grande de Camamu (BA)	0,5462	0,0001
Lagoa do Camacho (SC) x Lagoa dos Patos (RS)	0,0392	0,0207
Lagoa do Camacho (SC) x Lagoa de Carapebus (RJ)	0,3219	0,0001
Lagoa do Camacho (SC) x Barra Grande de Camamu (BA)	0,4996	0,0001
Lagoa dos Patos (RS) x Lagoa de Carapebus (RJ)	0,2586	0,0001
Lagoa dos Patos (RS) x Barra Grande de Camamu (BA)	0,5007	0,0001
Lagoa de Carapebus (RJ) x Barra Grande de Camamu (BA)	0,5423	0,0001

NOTA: ^{ns}: não significativo
negrito → alta diferenciação genética

TABELA 5 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES
(AMOVA – EXCOFFIER, 1992)

Populações	Fonte de Variação	Percentagem de Variação	θ_{ST}	p
Pontal do Sul x Laranjeiras	Entre loc.	1,05	0,01046	0,08992 ^{ns}
	Dentro loc.	98,95		
Pontal do Sul x Lagoa da Conceição	Entre loc.	5,62	0,05622	0,00000
	Dentro loc.	94,38		
Pontal do Sul x Lagoa do Camacho	Entre loc.	15,09	0,15089	0,00000
	Dentro loc.	84,91		
Pontal do Sul x Lagoa dos Patos	Entre loc.	11,76	0,11757	0,00000
	Dentro loc.	88,24		
Pontal do Sul x Lagoa de Carapebus	Entre loc.	16,68	0,16677	0,00000
	Dentro loc.	83,32		
Pontal do Sul x Barra Grande de Camamu	Entre loc.	32,75	0,32754	0,00000
	Dentro loc.	67,25		
Laranjeiras x Lagoa da Conceição	Entre loc.	4,42	0,04421	0,00000
	Dentro loc.	95,58		
Laranjeiras x Lagoa do Camacho	Entre loc.	15,21	0,15213	0,00000
	Dentro loc.	84,79		
Laranjeiras x Lagoa dos Patos	Entre loc.	10,74	0,10743	0,00000
	Dentro loc.	89,26		
Laranjeiras x Lagoa de Carapebus	Entre loc.	14,32	0,14320	0,00000
	Dentro loc.	85,68		
Laranjeiras x Barra Grande de Camamu	Entre loc.	19,99	0,30382	0,00000
	Dentro loc.	80,01		
Lagoa da Conceição x Lagoa do Camacho	Entre loc.	16,33	0,16327	0,00000
	Dentro loc.	83,67		
Lagoa da Conceição x Lagoa dos Patos	Entre loc.	12,02	0,12020	0,00000
	Dentro loc.	87,98		
Lagoa da Conceição x Lagoa de Carapebus	Entre loc.	16,15	0,16154	0,00000
	Dentro loc.	83,85		
Lagoa da Conceição x Barra Grande de Camamu	Entre loc.	34,82	0,34822	0,00000
	Dentro loc.	65,18		
Lagoa do Camacho x Lagoa dos Patos	Entre loc.	2,13	0,02126	0,02151
	Dentro loc.	97,87		
Lagoa do Camacho x Lagoa de Carapebus	Entre loc.	14,97	0,14972	0,00000
	Dentro loc.	85,03		
Lagoa do Camacho x Barra Grande de Camamu	Entre loc.	32,44	0,32439	0,00000
	Dentro loc.	67,56		
Lagoa dos Patos x Lagoa de Carapebus	Entre loc.	12,07	0,12070	0,00000
	Dentro loc.	87,93		
Lagoa dos Patos x Barra Grande de Camamu	Entre loc.	31,02	0,31024	0,00000
	Dentro loc.	68,98		
Lagoa de Carapebus x Barra Grande de Camamu	Entre loc.	35,29	0,35288	0,00000
	Dentro loc.	64,71		

NOTA: p: em teste com 1023 permutações

^{ns}: não significativo

loc.: localidade

negrito → alta estruturação populacional

5 DISCUSSÃO

Os peixes e outros organismos marinhos são os únicos animais selvagens consumidos pela espécie humana em grande escala através da exploração direta de populações naturais. Assim, os problemas (e as soluções) encontrados na sua exploração são completamente diferentes daqueles oriundos da exploração de plantas e animais domésticos cuja extinção não se encontra ameaçada como no caso dos animais marinhos (SOLÉ-CAVA, 2001).

Outro fator importante a ser considerado é a grande interferência antropogênica sofrida pelos ambientes aquáticos através do despejo de resíduos químicos e orgânicos. Populações de peixes e outros organismos deste local têm que se adaptar constantemente a mudanças ambientais (SOFIA et al., 2006). Desta maneira, o conhecimento dos efeitos da variabilidade genética em espécies de peixes é de vital importância para o entendimento de como a diversidade está distribuída entre as populações. Técnicas genéticas de manejo, conservação e criação de peixes, por exemplo, dependem do conhecimento da quantidade de variação dentro de cada unidade reprodutiva local (CARVALHO, 1993). Portanto, para entender a dinâmica de populações não somente é necessário quantificar as estruturas atuais mas também é necessário estudar as circunstâncias que determinaram as mesmas (LEUZZI; ALMEIDA; ORSI, 2004).

Através dos resultados fornecidos pela AMOVA (Tabela 5), Teste de MANTEL (Tabela 4), Gráficos de Coordenadas Principais bidimensionais e tridimensionais (Figuras 23, 24 e Apêndice 3) e Dendrograma (Apêndice 2) em exemplares de *Atherinella brasiliensis* de sete diferentes localidades sugere-se a existência de quatro diferentes populações:

a) População 1: poderia ser formada pelos exemplares das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Lagoa de Conceição (SC).

Por meio dos resultados obtidos (Tabelas 4 e 5), os indivíduos das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) formam uma população homogênea sendo o $\theta_{ST} = 0,01046$ fornecido pela AMOVA e $r = 0,0177$ fornecido pelo Teste de MANTEL com o p não significativo nas duas análises (0,08992 e 0,1082 respectivamente). Como estas duas regiões estão muito próximas geograficamente, pode-se inferir que esteja ocorrendo fluxo gênico entre os indivíduos destas duas localidades e desta forma a homogeneização seria uma consequência.

Os resultados obtidos através da AMOVA e pelo Teste de MANTEL ($\theta_{ST}=0,04421$ e $r=0,0847$) para os exemplares das localidades de Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC) indicam que as mesmas já apresentam um grau de diferenciação genética com o p altamente significativo (Tabelas 4 e 5). Porém, segundo a classificação de WRIGHT (1978), os indivíduos destas duas localidades formam uma população praticamente homogênea caracterizada por baixa diferenciação e estruturação genética. Como esta espécie não realiza migração horizontal (HOSTIM-SILVA et al., 1995), e os exemplares da Lagoa da Conceição (SC) se encontram praticamente isolados, pode-se sugerir que independentemente das causas, a maior parte do litoral brasileiro tenha estado em submersão até cerca de 5.150 anos atrás seguida de emersão até nossos dias (SUGUIO et al., 1985). As flutuações do nível relativo do mar, associadas às modificações climáticas no decorrer do Quaternário, desempenharam um papel fundamental na formação das planícies sedimentares do litoral brasileiro alterando a morfologia do ambiente estuarino devido à maior ou menor incidência de água salgada no mesmo e/ou também devido às alterações climáticas (ANGULO et al., 2005). Como as transformações ocorridas no nível do mar com formações das baías aconteceram num período recente, os efeitos da fragmentação sobre a estruturação da diversidade genética podem ainda ser pequenos e não totalmente detectáveis pela técnica de RAPD. O isolamento recente dos exemplares destas duas localidades poderia caracterizar o fator evolutivo denominado de deriva genética sendo que as diferenças ambientais poderiam ser as responsáveis por selecionar e promover a diferenciação genética entre os indivíduos destas regiões ao longo do tempo. Devido ao ambiente estuarino ser variável, pode-se sugerir que diferentes tipos de genótipos sejam selecionados em diferentes tipos de ambientes favorecendo o aparecimento de populações geneticamente distintas.

Quanto aos exemplares de Pontal do Sul (PR) e Lagoa da Conceição (SC), observa-se um aumento da diferenciação genética $r=0,1142$, com uma moderada estruturação populacional segundo a classificação de WRIGHT (1978) indicada pela AMOVA ($\theta_{ST}=0,05622$) com o p altamente significativo (Tabelas 4 e 5). Através dos resultados obtidos com o marcador RAPD, pode-se sugerir que o isolamento dos exemplares destas duas localidades tenha ocorrido há mais tempo que nas duas localidades anteriores, sendo os fatores determinantes da diferenciação genética

semelhantes aos acima descritos. Porém, como a estruturação é incipiente entre os exemplares de Pontal do Sul e Lagoa da Conceição (SC) e praticamente homogênea entre Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (PR) pode-se considerar, com base na classificação de WRIGHT (1978), que estas três localidades pertencem ainda a uma mesma população que foi designada de População 1.

b) **População 2:** formada pelos exemplares das localidades de Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa dos Patos (RS) segundo os resultados fornecidos pela AMOVA ($\theta_{ST} = 0,02126$) e pelo Teste de MANTEL ($r=0,0392$) sendo os valores de p altamente significativos (Tabelas 4 e 5). Como os exemplares destas duas localidades não migram para o mar aberto e se encontram isolados, sugere-se que a homogeneidade encontrada entre os mesmos seja devida ao mesmo fator daquele sugerido para os exemplares de Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição (SC), ou seja, o tempo de isolamento talvez não tenha sido suficiente para promover uma possível diferenciação genética, ou, os efeitos da fragmentação sobre a estruturação da diversidade genética podem ainda ser pequenos e não totalmente detectáveis pelo marcador de RAPD.

c) **População 3:** formada pelos exemplares da localidade de Lagoa de Carapebus (RJ) estando moderadamente estruturada e diferenciada em relação às demais localidades segundo os resultados fornecidos pela AMOVA (Tabela 5) e pelo Teste de MANTEL (Tabela 4) sendo os valores de p altamente significativos. Além de a distância geográfica ser maior entre os exemplares desta localidade e as demais dificultando o fluxo gênico, visto que esta espécie não realiza migração horizontal, as diferenças ambientais têm sido indicadas como um importante fator responsável pela diferenciação genética (HENDRY et al., 2000), ou seja, selecionando os indivíduos que melhor se adaptam.

d) **População 4:** formada pelos exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) estando altamente estruturada e diferenciada em relação às demais segundo os resultados fornecidos pela AMOVA (Tabela 5) e pelo Teste de MANTEL (Tabela 4) com os valores de p altamente significativos. Neste caso, os exemplares desta localidade se encontram isolados das demais regiões a uma distância de aproximadamente 2000 km sendo altamente expressiva, visto que esta espécie não realiza migração horizontal.

Estruturação populacional e diferenciação genética foram observadas em peixes de águas continentais através do marcador molecular de RAPD como demonstraram os estudos realizados por SOFIA et al. (2006) em *Astyanax scabripinnis*, por MATOSO, ARTONI e GALETTI Jr. (2004) em *Astyanax* sp., por LEUZZI, ALMEIDA e ORSI (2004) em *Astyanax altiparanae*, por HATANAKA e GALETTI Jr. (2003) em *Prochilodus marggravii*, por ALMEIDA, SODRÉ e CONTEL (2003) em *Pimelodus maculatus*, por WASKO e GALETTI Jr. (2002) em *Brycon lundii*, por DERGAM et al. (1998, 2002) em *Hoplias malabaricus*, e por PRIOLI et al. (2000) em *Gymnotus cf. carapo*.

A estrutura genética das populações marinhas reflete a interação histórica e contemporânea entre uma série de processos ecológicos, demográficos, comportamentais, genéticos, oceanográficos, climáticos e tectônicos. Os efeitos combinados desses mecanismos, atuando em escalas temporal e espacial, determinam as taxas e padrões de dispersão de zigotos, larvas e adultos. São esses movimentos, aliados à sobrevivência e sucesso reprodutivo dos imigrantes que, por sua vez, controlam a escala em que processos casuais (deriva genética) e deterministas (seleção natural) levarão à formação ou erosão da estrutura genética dentro e entre grupos de indivíduos (AFFONSO, 2004).

De um modo geral, vários autores têm proposto que os níveis de variação genética interpopulacional de peixes marinhos são, em geral, inferiores aos encontrados em peixes dulcícolas e animais terrestres (DEWOODY; AVISE, 2000). Estudos por RAPD em outras espécies de teleósteos deste ambiente também têm levado a sugestões similares (CHOW et al., 2000). Esse fato parece estar associado às estruturas das populações das espécies marinhas, onde o fluxo gênico é menos restrito e a formação de barreiras geográficas é bem inferior à detectada em águas continentais. Com isso, têm-se grandes populações em ambiente marinho e uma maior tendência de homogeneização genética entre elas (LACSON, 1992; WARD; WOODWARD; SKIBINSKI, 1994).

Apesar do fluxo gênico ser menos restrito e a formação de barreiras geográficas ser inferior ao que ocorre em águas continentais, o aumento dos estudos com marcadores genéticos em peixes marinhos tem demonstrado níveis elevados de variação e estruturação populacional e a presença de estoques naturais diferenciados em peixes deste ambiente (GOMES; DALES; OXENFORD, 1998;

DEWOODY; AVISE, 2000). A não detecção dessas diferenças *a priori* no ambiente marinho pode levar ao agrupamento de estoques diferenciados nas análises, partindo do pressuposto que as espécies formam grandes populações panmíticas e exibem elevado fluxo gênico. No entanto, atualmente, é cada vez maior o número de trabalhos que revelam a existência de barreiras migratórias, muitas vezes não identificadas, entre organismos marinhos, aparentemente de grande capacidade dispersiva, que levam à separação genética das populações dentro de poucas dezenas de quilômetros (SOLÉ-CAVA; RUSSO; SILVA, 1992; SILVA, 2002; MAGGIONI; ROGERS; MACLEAN, 2003).

Diferenciação e especiação em organismos marinhos são pouco documentados, entretanto há um crescente reconhecimento que processos levando a padrões de diferenciação biológica em organismos marinhos podem ser diferentes daqueles que ocorrem em organismos de água doce. Dados da literatura sugerem que nos ambientes marinhos a estrutura genética populacional é influenciada por necessidades ecológicas espécie-específicas e história de vida e, portanto, a diferenciação genética em peixes marinhos é altamente influenciada por sua capacidade de dispersão (ROCHA et al., 2005). Os fatos acima descritos podem estar relacionados com os resultados encontrados no presente trabalho onde estruturação e diferenciação genética foi observada através do marcador RAPD nos exemplares das diferentes populações e que, provavelmente, foram determinados pelo isolamento das mesmas como no caso da Barra Grande de Camamu (BA) e Lagoa de Carapebus (RJ) e pelas diferentes necessidades dentro de cada ambiente como no caso da Lagoa do Camacho (SC), por exemplo.

Populações estruturadas usualmente apresentam uma dinâmica de equilíbrio entre fatores evolutivos os quais favorecem a diferenciação (mutação, deriva e seleção natural disruptiva ou direcional diferencial em cada área) e fatores homogeneizantes (migração, seleção natural purificadora e seleção natural balanceada ou diferenciada, uniformes em cada área) (SOLÉ-CAVA, 2001). Os fatores homogeneizantes acima citados poderiam estar agindo sobre os exemplares das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) visto que estes indivíduos formam uma população homogênea, enquanto nos exemplares das demais localidades, que já se encontram num processo de moderada a alta estruturação, os fatores de diferenciação estariam agindo.

A diferenciação genética populacional pode ser dirigida por fatores ecológicos, históricos e evolucionários. Dentre os fatores ecológicos, as diferenças ambientais têm sido indicadas como um dos importantes aspectos que promovem a diferenciação genética entre as populações (HENDRY et al., 2000). Em *Barbus neumayeri*, diferenciação genética entre sítios de amostras que apresentam diferentes proporções de oxigênio pôde representar um efeito de pressão seletiva (CHAPMAN et al., 1999). Os autores sugeriram não existir relacionamento entre diferenciação genética e distância geográfica visto que populações próximas o suficiente para serem homogêneas eram geneticamente diferenciadas. Esta observação pode ser feita entre os exemplares das localidades de Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa da Conceição (SC) ($\theta_{ST} = 0,16327$ e $r = 0,3519$) que estão mais próximas geograficamente do que os exemplares de Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa de Carapebus (RJ) ($\theta_{ST} = 0,14972$ e $r = 0,3219$) mas que no entanto apresentam uma diferenciação genética maior. Outro exemplo são os indivíduos das localidades de Lagoa dos Patos (RS) e da Lagoa de Carapebus (RJ) ($\theta_{ST} = 0,12070$ e $r = 0,2586$) que apresentam um valor de θ_{ST} semelhante ao encontrado entre Lagoa dos Patos (RS) e Lagoa da Conceição (SC) ($\theta_{ST} = 0,12020$ e $r = 0,2433$) sendo que estas duas últimas populações se encontram a uma distância muito menor. Desta forma, pode-se observar que exemplares de localidades mais próximas podem apresentar uma diferenciação genética maior do que indivíduos que se encontram mais distantes geograficamente. Esta observação sugere existir uma possível correlação entre variação genética e área geográfica (WASKO; GALETTI Jr., 2002; MATOSO; ARTONI; GALETTI Jr., 2004), ou ainda, que a diferenciação genética não está diretamente relacionada à distância geográfica mas sim às condições ambientais (CHAPMAN et al., 1999).

Além das condições ambientais, muitos autores sugerem que as glaciações do Pleistoceno foram o evento mais significativo para moldar padrões filogeográficos do DNA mitocondrial e a estrutura populacional em espécies de peixes marinhos (BEHEREGARAY; SUNNUCKS; BRISCOE, 2002). Outros fatores ecológicos podem ser determinantes para o isolamento reprodutivo das espécies como é o caso das correntes marinhas ou as variações de temperatura.

SANTOS et al. (2006) estudando o peixe *Macrodon ancylodon* de 12 diferentes locais sendo um da Venezuela, 10 da costa brasileira (desde o Amapá até

o Rio Grande do Sul) e um da costa da Argentina observaram a existência de dois clados geneticamente distintos na região tropical e subtropical da costa Atlântica separados entre os estados da Bahia (12°S) e Espírito Santo (20°S). Segundo estes autores existem dois diferentes fatores que podem atuar como barreiras ao fluxo gênico: as diferenças de temperatura e a divisão física das correntes do Sul Equatorial (em Norte Brasil e Brasil corrente). As populações da região tropical (primeiro grupo) habitam áreas influenciadas pelas correntes Norte Brasil e Brasil as quais transportam águas quentes (temperatura média da água em 12°S é de 26°C no inverno e 28,5°C no verão). O segundo grupo habita regiões afetadas pela corrente Brasil que é altamente influenciada pelas águas frias derivadas das correntes das Malvinas e Águas do Atlântico Sul Central (originadas da convergência subtropical).

LOWE-McCONNELL (1999) afirma que a temperatura da água é um dos principais fatores que afetam a distribuição de peixes marinhos. Estudos genéticos realizados com populações de *Fundulus heteroclitus*, um peixe de água salobra encontrado ao longo da costa leste da América do Norte, revelou que existem diferenças genéticas entre as populações do sul e do norte, as quais foram atribuídas a adaptações térmicas locais das populações (SCHULTE, 2001). Padrões similares foram também observados em *Cyprinodon variegatus*, o qual apresentou uma distribuição similar ao *Fundulus heteroclitus* (TURNER et al., não publicado em SANTOS et al., 2006). Considerando estas informações, verifica-se que os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) se encontram isolados geograficamente das demais populações por qualquer um dos fatores acima citados, visto que os indivíduos analisados foram coletados a 13°S na região de Marau (BA).

Além dos fatores ambientais e geográficos acima citados que podem promover a diferenciação populacional podemos citar também o instinto *homing* que ocorre nos peixes salmonídeos e que parece ser um fator decisivo para uma forte subdivisão populacional. O processo conhecido por *homing* é verificado em várias espécies animais incluindo aves, mamíferos, répteis e peixes marinhos e consiste na migração dos mesmos até o seu local de nascimento para completar o seu ciclo reprodutivo (HATANAKA; GALETTI Jr., 2003; BATISTA; ALVES-GOMES, 2006). Visto que a espécie *Atherinella brasiliensis* é um peixe residente de ambientes

estuarinos, não migrador, o fator *homing* não parece interferir nos processos de sua diferenciação populacional.

Apesar dos fatores acima citados serem importantes para a estruturação populacional, é necessário ressaltar que a variabilidade genética dos indivíduos existentes será o fator fundamental sobre o qual o meio ambiente vai agir selecionando aqueles que melhor se adaptam. Desta maneira, como *A. brasiliensis* forma populações isoladas em ambientes estuarinos, que são variáveis quanto à salinidade, temperatura, marés, regime pluviométrico, turbidez, além de sua própria zoogeografia, a variação em qualquer um destes fatores poderá alterar este ambiente como um todo. Como observado através da AMOVA (Tabela 5), o nível de diversidade intrapopulacional dos exemplares de *A. brasiliensis* é alto, sendo este um fator essencial para a adaptação a novas mudanças de ambiente. A variabilidade genética é necessária para as mudanças adaptativas evolucionárias sendo que novas variações entram numa população através de mutações ou, como resultado de fluxo gênico através de cruzamentos entre populações distintas. Se o fluxo gênico entre populações vizinhas é intenso como no caso da População 1 que é formada pelas localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) elas tendem a se homogeneizar e por consequência acabam seguindo caminhos evolutivos similares. Por outro lado, se o fluxo gênico é restrito, cada população se desenvolverá de uma maneira independente (ALMEIDA; SODRÉ; CONTEL, 2003) seguindo seu próprio caminho evolutivo como é o caso das Populações 3 e 4. Como a espécie *A. brasiliensis* não realiza migração horizontal, as variações que ocorrem nos exemplares destas localidades provavelmente são oriundas de novas mutações e assim, os indivíduos destes locais estão formando populações geográfica e geneticamente isoladas por deriva genética e por pressão de seleção decorrentes de diferentes condições ambientais. Devido às condições ambientais de cada estuário serem diferentes, estas estarão exercendo distintas pressões seletivas sobre os organismos e, desta forma, distintos conjuntos gênicos estarão sendo selecionados em cada uma destas localidades estudadas.

Pela análise dos resultados obtidos através da técnica de RAPD observou-se uma grande variação na frequência de bandas formadas com os 12 diferentes iniciadores utilizados neste trabalho. Algumas bandas estavam presentes em somente um ou dois indivíduos de uma ou duas localidades analisadas como se

pode observar na Tabela 3 na amplificação com os iniciadores OPX04 (~400 pb), OPX07 (~900 pb – Figura 14 f vide seta), OPW09 (~1050 pb), OPK14 (~980 pb), OPA06 (~650 pb, ~580 pb, ~400 pb) demonstrando a existência de uma variabilidade intrapopulacional sobre a qual a seleção ou a deriva poderá agir. Outras bandas estavam presentes em 100% dos indivíduos de um determinado local, como por exemplo de Barra Grande de Camamu (BA), enquanto sua frequência foi muito baixa dentro das amostras das demais localidades, como demonstra a amplificação com o iniciador OPW03 no fragmento de aproximadamente ~730 pb (Tabela 3 e Figura 15 – vide seta). Já a banda de aproximadamente 600 pb gerada através do iniciador OPX17 (Tabela 3 e Figura 19 – vide seta) ocorreu exclusivamente em 30% dos exemplares de Barra Grande de Camamu (BA). Este fato indica uma possível correlação entre variação genética e área geográfica como observado no trabalho desenvolvido por WASKO e GALETTI Jr. (2002) no peixe *Brycon lundii*, através do marcador de RAPD. Os autores verificaram a presença de um fragmento de ~1200 pb em 100% dos exemplares de uma determinada região. Considerando que cada banda visualizada no gel corresponde a um loco gênico com segregação mendeliana independente, sugere-se que a presença de bandas específicas em 100% dos exemplares de algumas regiões ou aquelas exclusivas de determinados locais esteja relacionada à fixação de distintos alelos. Vários fragmentos tiveram a sua frequência diminuída como nos exemplares de Barra Grande de Camamu (BA) (Tabela 3) na amplificação com o iniciador OPW06 (~1650 pb) chegando à ausência completa (~1200 pb), tendo este último fato ocorrido também na amplificação através do iniciador OPK14 (~650 pb) para a população de Lagoa de Carapebus (RJ) (Tabela 3 e Figura 21 – vide seta), demonstrando mais uma vez a alta correlação entre variação genética e área geográfica.

Com os resultados alcançados com os marcadores de RAPD, pode-se sugerir a ocorrência de quatro populações geneticamente distintas, sendo que os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA), apresentam uma alta diferenciação genética em relação aos indivíduos das demais regiões analisadas. Os valores obtidos através do Teste de MANTEL (r) estão acima de 0,50 podendo ser considerados expressivos quando os exemplares analisados pertencem à mesma espécie. Da mesma forma, os valores de θ_{ST} caracterizam como alto o processo de

estruturação genética desta população em relação às demais analisadas. Desta maneira, devido ao acentuado isolamento geográfico dos exemplares desta população e aos resultados encontrados pela AMOVA, Teste de MANTEL, Análise de Componentes Principais (bi e tridimensionais) e através do Dendrograma sugere-se que a mesma esteja em um processo de especiação. Os resultados encontrados para os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) corroboram com aqueles obtidos por SANTOS et al. (2006) onde dois clados geneticamente distintos do peixe *Macrodon ancylodon* foram encontrados na região tropical e subtropical da costa brasileira identificando uma barreira ao fluxo gênico entre os estados da Bahia (12°S) e Espírito Santo (20°S).

A utilização de um grupo externo durante o estudo teve por objetivo avaliar se os indivíduos analisados pertenciam a uma mesma espécie. Todavia, como o gênero *Atherinella* é o único representante da sua tribo no Hemisfério Sul e a espécie *A. brasiliensis* é a única representante do seu gênero no Oceano Atlântico (DYER, 2006), o *O. argentinensis* foi selecionado como grupo externo nas análises de agrupamento. Porém, a grande distância entre estas inviabilizou a aquisição de dados referentes às interações filogeográficas de *A. brasiliensis*, pois a análise tornou-se insuficientemente resolutive. Entretanto, os marcadores de RAPD foram altamente eficazes na análise molecular da diversidade genética, bem como da estruturação populacional dessa espécie. Para que questões filogenéticas e filogeográficas sejam mais bem encaminhadas nessa espécie sugere-se a realização de novos estudos com outros marcadores moleculares mais resolutivos para confirmar os dados obtidos no presente trabalho e se possível com a introdução de um grupo externo mais próximo.

Especiação incipiente foi observada nos aterinídeos *Odontesthes argentinensis* de seis localidades sendo três estuarinas (Lagoa Custódia e Lagoa dos Patos, RS e Lagoa Rocha, Uruguai) e três marinhas (praia do Cassino, RS, Montevideo e Puerto Madryn, Argentina). Não foi observada diferença significativa entre as três populações estuarinas ou as três marinhas através do marcador de microsatélite usado neste trabalho realizado por BEHEREGARAY e SUNNUCKS (2001). Porém, apesar da estrutura morfológica semelhante, grandes diferenças foram observadas entre os exemplares das diferentes regiões, além do fato de elas não se intercruzarem.

BEHEREGARAY, SUNNUCKS e BRISCOE (2002) utilizando os marcadores de microssatélites investigaram padrões de divergência populacional e relacionamento evolutivo nos grupos de água doce de peixes *silversides* do complexo *Odontesthes perugiae* do sul do Brasil. Para estes autores, os ancestrais do *O. perugiae* (lacustres) tinham altos níveis de variabilidade genética e haviam sido recentemente pré-adaptados para a instabilidade ambiental em águas estuarinas como é o caso do *silverside* aterinídeo *Odontesthes argentinensis*.

Apesar dos trabalhos acima citados terem sido desenvolvidos por meio de outro marcador, foram citados no presente estudo devido aos peixes analisados pertencerem à mesma família da *Atherinella brasiliensis* e também fazerem parte do ambiente estuarino. O fato de a *Atherinella brasiliensis* ser também um aterinídeo, e como foi observado através da AMOVA (Tabela 5), possuir uma alta variabilidade dentro das localidades analisadas, poderá proporcionar a adaptação a variações ambientais.

A despeito do seu pequeno porte, a espécie *A. brasiliensis* é importante fonte de renda e alimentar para os pescadores das regiões onde ela ocorre devido a sua constância e abundância durante todos os meses do ano. Devido a sua importância para os ambientes estuarinos, o objetivo deste estudo foi avaliar através do marcador de RAPD a variabilidade genética dentro e entre os exemplares das sete diferentes localidades com o objetivo de implantar no futuro programas de manejo e conservação para esta espécie. Outro fator importante é que as regiões de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) por se encontrarem próximas ao Porto de Paranaguá têm o seu ambiente constantemente alterado provocando danos aos organismos que habitam estes locais. Desta maneira, o conhecimento da variabilidade genética é de fundamental importância para se entender como a diversidade está distribuída entre as populações a fim de que no futuro possam ser desenvolvidos programas para a preservação desta espécie.

Como foi sugerido através das análises com o marcador de RAPD que os indivíduos das sete localidades estudadas se distribuem em quatro populações geneticamente distintas, se for necessário promover um estudo de manejo e conservação para esta espécie, poder-se-ia manter exemplares da População 1 (formada pelos exemplares de Pontal do Sul e Laranjeiras - PR e pelos da Lagoa da Conceição - SC) protegidos em uma área não poluída a fim de que pudessem ser re-

introduzidos nestes três ambientes quando necessário. Da mesma forma estas medidas devem ser tomadas para os exemplares da População 2 (formada pelos exemplares das localidades de Lagoa do Camacho – SC e Lagoa dos Patos-RS), População 3 (formada pelos exemplares da Lagoa de Carapebus- RJ) e População 4 (formada pelos exemplares da Barra Grande de Camamu- BA). Os peixes destas populações são geneticamente diferenciados e se encontram adaptados ao ambiente onde vivem. Portanto, qualquer estratégia de conservação deve ser focada num esforço conjunto para preservar as diferenças entre estas regiões, pois, qualquer adaptação local poderia ser perdida se estas diferentes populações fossem misturadas.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram alcançados de forma satisfatória, pois, sem o conhecimento de como a diversidade está distribuída dentro e entre os exemplares de uma espécie nenhuma medida de conservação e preservação a respeito da mesma poderiam ser tomadas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho a partir do marcador molecular de RAPD em exemplares de *Atherinella brasiliensis* das localidades de: Pontal do Sul e Laranjeiras (PR), Lagoa da Conceição e Lagoa do Camacho (SC), Lagoa dos Patos (RS), Lagoa de Carapebus (RJ) e Barra Grande de Camamu (BA) conclui-se que:

- a) A técnica de RAPD utilizada neste trabalho foi eficiente no acesso à diversidade genética dentro e entre os exemplares das diferentes localidades analisadas;
- b) Existe diversidade genética entre os exemplares das sete diferentes regiões analisadas;
- c) Os exemplares das sete localidades avaliadas se encontram estruturados em quatro diferentes populações geneticamente distintas;
- d) Para fins de conservação e manejo a População 1 formada pelas localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR) e Lagoa da Conceição devem ser tratadas como uma unidade reprodutiva independente bem como os exemplares da População 2 formada pelas localidades de Lagoa do Camacho (SC) e Lagoa dos Patos (RS), População 3 formada pelos exemplares da localidade de Lagoa de Carapebus (RJ) e os exemplares da População 4 formada pela localidade de Barra Grande de Camamu (BA);
- e) Devido à alta diferenciação genética encontrada entre os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) em relação às demais regiões analisadas sugere-se que esta população esteja em processo de especiação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, P. R. A. M. **Marcadores moleculares na análise de espécies e composição populacional de peixes marinhos de recifes de corais da Família Pomacanthidae (Perciformes)**. São Carlos, 2004. 158 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

ALMEIDA, F. S. **Análise da variabilidade genética em Pimelodidae e Rhamdiidae (Pisces –Siluriformes) da bacia do rio Tibagi**. Londrina, 1998. 102 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina.

ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. **J. Zool., Lond.**, 253, 113-120, 2001.

ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, 26(3), 301-305, 2003.

ANDREATA, J. V.; SAAD, A. M.; MORAES, L. A. F.; SOARES, C. L.; MARCA, A. G. Associações, similaridade e abundância relativa dos peixes da Laguna de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil. **Boletim do Museu Nacional, N. S., Zoologia**, Rio de Janeiro, 335, 1-25, 1992.

ANDREATA, J. V.; MARCA, A. G.; SOARES, C. L.; SANTOS, R. S. Distribuição mensal dos peixes mais representativos da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Rio de Janeiro 14, 121-134, 1997.

ANGULO, J. R.; LESSA, G. C.; SOUZA, M. C. A critical review of mid- to late-Holocene sea-level fluctuations on the eastern Brazilian coastline. **Quaternary Science Reviews**, 2005.

ATIENZAR, F. A.; JHA, A. N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. **Mutation Research**, 613, 76-102, 2006.

BAMBER, R. N.; HENDERSON, P. A. Pré-adaptative plasticity in atherinids and the estuarine seat of teleost evolution. **J. Fish Biol.**, 33, 17-23, 1988.

BARBIERI, L. R. R.; ANDREATA, J. V.; SANTOS, M. A.; SILVA, M. H. C.; SEBILIA, A. S. C.; SANTOS, R. P. Distribuição e ciclo de vida das espécies de peixes mais abundantes da Laguna de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Rio de Janeiro, 7(3), 223-243, 1990.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in Tilapia fish species and subspecies identification. **Heredity**, 73, 117-123, 1994.

BARTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G. H.; KOVÁCS, B.; URBÁNY, B.; TAMÁS, G.; HORVÁTH, L.; ORBÁN, L. Genetic analysis of two common carp broodstocks. **Aquaculture**, 219, 157-167, 2003.

BATISTA, J. S.; ALVES-GOMES, J. A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes- Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, 5(4), 723-740, 2006.

BEGG., G. A.; WALDMAN, J. R. An holistic approach to fish stock identification. **Fisheries Research**, 43, 35-44, 1999.

BEHEREGARAY, L. B.; SUNNUCKS, P.; BRISCOE, D. A. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceedings of the Royal Society of London. Series b, Biological Sciences**, 269, 65-73, 2002.

BEHEREGARAY, L. B.; SUNNUCKS, P. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. **Molecular Ecology**, 10, 2849-2866, 2001.

BEMVENUTI, M. de A. Abundância, distribuição e reprodução de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da lagoa dos Patos, RS, Brasil. **Atlântica**, 9 (1): 5-32, 1987.

BIELAWSKI, J. P.; PUMO, D. E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. **Heredity**, 78, 32-40, 1997.

CAGIGAS, M. E.; VAZQUEZ, E.; BLANCO, G.; SANCHEZ, J. A. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. **Marine Biotechnology**, 1(3), 286-296, 1999.

CALLEJAS, C.; OCHANDO, M. D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. **Journal of Fish Biology**, 53, 208-215, 1998.

CARVALHO, G. R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology**, 43, 53-73, 1993.

CHAPMAN, L. J.; CHAPMAN, C. A.; BRAZEAU, D. A.; Mc LAUGHLIN, B.; JORDAN, M. Papyrus swamps, hypoxia, and faunal diversification: variation among populations of *Barbus neumayeri*. **Journal of Fish Biology**, 54, 310-327, 1999.

CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. **Acta Scientiarum**, Maringá, 23, 445-451, 2001.

CHOW, S.; OKAMOTO, H.; MIYABE, N.; HIRAMATSU, K.; BARUT, N. Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. **Molecular Ecology**, 9, 221-227, 2000.

COELHO, A. S. G. **Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap**. Laboratório de Genética e Genômica de Plantas – DBG/ICB/UFG, 2004.

CORAZZA, L. C. Q.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Análises da Variabilidade genética de populações de *Geophagus brasiliensis* (Teleostei, Perciformes) usando marcadores de RAPD. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47º, 2001, Águas de Lindóia-SP. **Relação de Trabalhos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. 1 CD-ROM.

DAHLE, G.; RAHMAN, M.; ERIKSEN, A. G. RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenuulosa ilisha*). **Fisheries Research**, 32, 263-269, 1997.

DA SILVA CORTINHAS, M. C.; CESTARI, M. M.; SWARÇA, A. C.; FENOCCHIO, A. S. First Chromosome Data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the South coast of Brazil. Conventional, C- NOR and CMA₃ bandings and FISH studies. **Caryologia**, Florença, 56 (2), 187-191, 2003.

DERGAM, J. A.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L. F.; JÚLIO Jr., H. F.; GIULIANO-CAETANO, L.; BLACK IV, W. C. Molecular biogeography of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi and Paraná Rivers. **Genetics and Molecular Biology**, 21 (4), 493-496, 1998.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25 (4), 379-387, 2002.

DE WOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine freshwater and anadromus fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, 56, 461-473, 2000.

DYER, B. S. H. Systematic revision of South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, Escuela de Recursos Naturales, Universidad del Mar, 30 (1), 69-88, 2006.

EXCOFFIER, I.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479-491, 1992.

FRANÇA, E. J. **Abundância distribuição e caracterização morfológica de larvas de *Atherinella brasiliensis* (Atherinopsidae, Atheriniformes) no estuário do rio Jaguaribe, Pernambuco, Brasil**. Recife, 2005. 42f. Dissertação apresentada ao

Mestrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal de Pernambuco.

FAVARO, L. F.; LOPES, S. C. G.; SPACH, H. L. Reprodução do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy e Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae) em uma planície de maré adjacente à gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 20(3), 501-506, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. Brasília: Embrapa – Senargem, 1998.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 110p, 1978.

FUCHS, H.; GROSS, R.; STEIN, H.; ROTTMANN, O. Application of molecular genetic markers for the differentiation of bream (*Abramis brama* L.) populations from the rivers Main and Danube. **J. Appl. Ichthyol.**, 14, 49-55, 1998.

GOMES, C.; DALES, R. B. G.; OXENFORD, H. A. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. **Molecular Ecology**, 7, 1029-1039, 1998.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, 79, 413-425, 1998.

HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; OBEIDA, A.; ITRIBY, H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, 35, 587-593, 2004.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, 26(1), 19-25, 2003.

HENDRY, P. A.; WENBURG, J. K.; BENTZEN, P.; VOLK, E. C.; QUINN, T. P. Rapid Evolution of Reproductive Isolation in the wild: Evidence from Introduced Salmon. **Science**, 290, 516-518, 2000.

HOSTIM-SILVA, M.; CLEZAR, L.; RIBEIRO, G. C.; MACHADO, C. Estrutura populacional de *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes-Atherinidae) na Lagoa da Conceição, SC, Brasil. **Arq. Biolo. Tecnol.**, 38(3): 949-960, 1995.

ITURRA, P.; MEDRANO, J. F.; BAGLEY, M.; LAM, N.; VERGARA, N.; MARIN, J. C. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. **Genetica**, 101, 209-213, 1998.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.**, 37, 547-579, 1901.

KOH, T. L.; KHOO, G.; FAN, L. Q.; PHANG, U. P. genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon spp.*) as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **Aquaculture**, 173, 485-497, 1999.

LACSON, J. M. Minimal genetic variation among samples of six species of coral reef fishes collected at La Parguera, Puerto Rico, and Discovery Bay, Jamaica. **Marine Biology**, 112, 327-331, 1992.

LEHMANN, D.; HETTWER, H.; TARASCHEWSKI, H. RAPD-PCR investigation of systematic relationship among four species of eels (Teleostei: Anguillidae), particularly *Anguilla anguilla* and *A. rostrata*. **Marine Biology**, 137 (2), 195-204, 2000.

LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 27 (3), 335-362, 2004.

LIU, Z. J.; LI, P.; ARGUE, B. J.; DUNHAM, R. A. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, 174, 59-68, 1999.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos Técnicos e Interpretação Genética. **Biociência e Desenvolvimento**, 29, 5, 2002.

LOWE- McCONNEL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, 3, 91-99, 1994.

LUCENA, C. A. S. Os Peixes-rei do Sul do Brasil. **Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia**, Porto Alegre, 63, 7-8, Junho de 2001.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D.; MACLEAN, N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (decapoda, Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 12, 3213-3217, 2003.

MAMURIS, Z.; APOSTOLODIS, A. P.; THEODOROU, A. J.; TRIANTAPHYLIDIS, C. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Biology**, 132, 171-178, 1998.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer res.**, 27, 209-220, 1967.

MARTINEZ, I.; YMAN, I.M. Species identification in meat products by RAPD analysis. **Food Research International**, 31, 459-466, 1998.

MARTINS, C.; PORTO-FORESTI, F.; WASKO, A. P.; LEITÃO, G. R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 28, 12-15, 2002.

MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F.; GALETTI JR., P. M. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. **Hydrobiologia**, 527, 223-225, 2004.

MILLER, M. P. **Mantel Struct: A program for the detection of population structure through the use of Mantel Tests**. Department of Biological Sciences – BOX 5640, Northern Arizona University, 1999.

NADIG, S. G.; LEE, K. L.; ADAMS, S. M. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. **Aquatic Toxicology**, 43, 163-178, 1998.

OLIVEIRA, A. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; PAVANELLI, C. S.; JÚLIO Jr., H. F.; PANARARI, R. S. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. **Genetica**, 115, 259-267, 2002.

PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; ANDRADE, F. M.; PIRES, A. V. Divergência de populações de *Astyanax aff. bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae) na bacia do rio Doce – MG: uma abordagem molecular e morfológica. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47º, 2001, Águas de Lindóia-SP. **Relação de Trabalhos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. 1 CD-ROM.

PAIVA FILHO, A. M.; GIANNINI, R.; RIBEIRO NETO, F. B.; SCHMIEGELOW, J. M. M. Ictiofauna do complexo baía-estuarino de Santos e São Vicente, SP, Brasil. **Rel. in Inst. Oceanogra**. Universidade de São Paulo, 17, 1-10, 1987.

PAIVA FILHO, A. M.; GIANNINI, R. Contribuição ao conhecimento da biologia do peixe-rei, *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (Atherinidae) no complexo Baía Estuarino de Santos e São Vicente, Brasil. **Bolm. Inst. Ocen.**, São Paulo, 38(1), 1-9, 1990.

PESSANHA, A. L. M.; ARAÚJO, F. G.; AZEVEDO, M. C. C.; GOMES, I. D. Variações temporais e espaciais na composição e estrutura da comunidade de peixes jovens da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 17(1), 251-261, 2000.

PESSANHA, L. F.; ARAÚJO, F. G. Recrutamento do peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy e Gainard) (Atheriniformes, Atherinopridal) na margem continental da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 18 (4), 1265 – 1274, 2001.

PORTO-FILHO, E. **Sedimentometria e algumas considerações sobre a bioquímica dos sedimentos de fundo da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina**. Florianópolis - SC, 1993. 346 f. Dissertação de Mestrado em Geografia, Universidade Federal de Santa Catarina.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO Jr., H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetic and Molecular Biology**, 25(4), 421-430, 2002.

PRIOLI, A. J.; JÚLIO Jr. H. F.; PRIOLI, S. M. A. P.; PAVANELLI, C. S.; SOUZA, M. C.; ZAWADZKI, C. H. Variabilidade e estrutura genética de populações naturais. In: **Relatório 2000 - UEM - Componente Biótico**. Disponível em: < <http://www.nupelia.uem.br>. Acesso em: 15 de outubro de 2003.

PRITCHARD, D. W. What is an estuary. In: LAUFF, G. H. **Physical viewpoint**. ed Estuaries. Washington, American Association for the Advance of Science, 1967. p. 3-5.

RICHARDSON, T.; CATO, S.; RAMSER, J.; KAHL, G.; WEISING, K. Hibridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphism markers. **Nucleic Acids Research**, 23, 3798-3799, 1995.

ROCHA, L. A.; ROBERTSON, D. R.; ROMAN, J.; BOWEN, B. W. Ecological speciation in tropical reef fishes. **Proceedings of the Royal Society of London**. series B, Biological Sciences, 272, 573-579, 2005.

ROHLF, F. J. Numerical Taxonomy and multivariate Analysis System. NTSYS-pc. Manual. Version 2.1. **Applied Biostatistic**. Setauket - Department of Ecology and Evolution, New York: State University of New York.

SAMBROOK, K. J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2ª edição. New York :Cold Spring Harbor University Press, 1989.

SANTOS, A. C. A.; CASTELLUCI, F. R. C.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTOS, E. P.; SENA, M. P. Distribuição e recrutamento do peixe-rei *Xenomelaniris brasiliensis* (Osteichthyes, Atherinidae) na margem continental oeste da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. **Acta Biológica Leopoldinensia**, Feira de Santana, 21(1), 107-118, 1999.

SANTOS, S.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Scianidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**, 15, 4361-4373, 2006.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **ARLEQUIN ver 2000: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory Dept. of Anthropology and Ecology. University of Geneva. Switzerland.

SCHULTE, P. M. Environmental adaptations as windows on molecular evolution. Comparative biochemistry and physiology part B. **Biochemistry and Molecular Biology**, 128, 597-611, 2001.

SILVA, E. P. Especiação no ambiente marinho. In: PEREIRA, R. C. SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2002. p. 35-47.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. **Evolution**, 47, 264-279, 1993.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco, Califórnia, USA: Ed. WH Freeman, 1973.

SODRÉ, L. M. K.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L. Análise genética em *Apareiodon aff. piracicabae* (Pisces – Characidae) da Represa Capivara (Porecatu – PR). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47º, 2001, Águas de Lindóia-SP. **Relação de Trabalhos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. 1 CD-ROM.

SOFIA, S. H.; SILVA, C. R. M.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ, C. B. R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, 553, 245-254, 2006.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular**. Ribeirão Preto: Holos, Editora Ltda- ME, 2001. 171-192.

SOLÉ-CAVA, A. M.; RUSSO, C. A. M.; SILVA, E. P. Fluxo gênico e estruturação em populações de invertebrados marinhos bentônicos. **Revista Brasileira de Genética**, 15, 274-279, 1992.

SOUZA, A. B.; GALETTI Jr., P. M. Diferenciação genética entre um plantel cultivado e um estoque nativo do surubim pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) através de marcadores RAPD. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48º, 2002, Águas de Lindóia-SP. **Relação de Trabalhos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2002. p. 293. 1 CD-ROM.

SUGUIO, K.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A. C. S. P.; DOMINGUEZ, J. M. L.; FLEXOR, J. M. AZEVEDO, A. E. G. Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. **Revista Brasileira de Geociências**, 15(4), 273-286, 1985.

TAKAHITO, S.; TANIGUCHI, N. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. **Aquaculture**, 204, 271-281, 2002.

TABERLET, P. Biodiversity at the the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. **Journal of Biotechnology**, 64, 91-100, 1998.

THEODORAKIS, C. W.; SHUGART, L. R. Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. **Ecotoxicology**, 335-354, 1997.

VENDEL, A. L.; SANTOS, C.; NAKAYAMA, P.; SPACH, H. L. O uso de réplica no estudo da ictiofauna de uma planície de maré. **Acta Biol. Par.**, Curitiba, 29 (1,2,3,4), 177-186, 2000.

VIEIRA, J.; GARCIA, A. **Introdução a Ictiologia em Estuários**. Encontro Brasileiro de Ictiologia: Sociedade Brasileira de Ictilologia, 2007. 97 slides.

VENKATESH, P. Evolution and diversity of fish genomes. **Current Opinion in Genetics and Development**, 13, 1-5, 2003.

WARD, R. D.; WOODWARK, M.; SKIBINSKI, D. O. F. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromus fishes. **Journal of Fish Biology**, 44, 213-232, 1994.

WASKO, A. P.; GALETTI Jr., P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, 474, 131-137, 2002.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18, 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, D. J.; KAZIANIS, S.; WALTER, R. B. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. **Transactions of the American Fisheries Society**, 127, 825-832, 1998.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18, 6531-6535, 1990.

WOLF, H. D.; BLUST, R.; BACKELJAU, T. The use of RAPD in ecotoxicology. **Mutation Research**, 566, 249-262, 2004.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of population. Vol. 2: the theory of gene frequencies**. University of Chicago Press, Londres, 511p., 1978.

APÊNDICE 1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES

1) SOLUÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

a) TAMPÃO DE HOMOGENEIZAÇÃO (TH)

Estoque	[] Final	Volume para 10 mL
Tris HCl (pH 7,5 – 1 M)	10 mM	100 µL
NaCl	60 mM	120 µL
EDTA (pH 8,0 – 0,5 M)	10 mM	200 µL
Sacarose	5%	0,5 g
Espermina (50 mM)	0,15 mM	30 µL
Espermidina (125 mM)	0,15 mM	12 µL
Água destilada qsp		

b) TAMPÃO PS

Estoque	[] Final	Volume para 10 mL
Tris HCl (pH 9,0 – 1M)	0,2 M	2 mL
EDTA (pH 8,0 -0,5 M)	30 mM	600 µL
SDS 20%	2%	0,2 g
Sacarose	5%	0,5 g
Água destilada qsp		

c) TAMPÃO TE

Reagentes	Volume para 10 mL
Tris HCl (pH 7,5 – 1 M)	10 µL
EDTA (pH 8,0 – 0,5 M)	2 µL
Água destilada qsp	

Para 1/10 de Tampão TE

- 900 μL de ultra pura autoclavada
- 100 μL de tampão TE

d) PROTEINASE KConcentração de 20 mg/mL

- Para 100 mg: acrescentar 5 mL de glicerol 50%
- Aliquotar para 200 μL em microtubos novos e estéreis de 1,5-2,0 mL
- Manter em freezer -20°C

e) SDS 20%Para 50 mL

- Pesar 10 g de SDS (pm 288,38)
- Acrescentar 40 mL de H_2O ultra pura
- Homogeneizar em agitador magnético até dissolver
- Completar com q.s.p. 50 mL

f) EDTA 0,5M – pH 8,0

372,2 g.....1 M.....1000 mL

X g.....0,5 M 1000 mL

X= 186,1 g em 1000 mL de H_2O ultra pura

Para 100 mL pesar 18,61 g de EDTA

g) NaCl 5 MPara 200 mL

58,44 g.....1 M.....1000 mL

X g.....1 M.....200 mL

X= 11,69g

11,69 g.....1 M.....200 mL

X g.....5 M.....200 mL

X= 58,454 g em 200 mL de H_2O ultra pura

h) Tris HCl 1M

121,14 g de Tris base 1000 mL de água ultra pura 1 M

X g 50 mL de água ultra pura 1 M

X = 6,057 g em 50 mL de água ultra pura

Acertar o pH conforme o indicado com HCl e após completar o volume com água ultra pura autoclavada

i) RNAseConcentração de 10 mg/mL

- A RNAse utilizada foi da marca SIGMA (4875) sendo necessário ser fervida para não agir sobre o DNA;
- Foi preparada uma solução estoque de 10 mg/mL em tampão de acetato de sódio (10 mM e pH 5,2);
- A solução foi fervida a 100° C durante 15 min, seguido de frio à temperatura ambiente para depois ser ajustado o pH para 7,4 usando 0,1 volumes de TrisHCl pH 7,4;
- A seguir a solução foi aliquotada (200 µL) em microtubos novos e estéreis de 1,5 mL.

2) PREPARO DE SOLUÇÃO PARA MEDIR A CONCENTRAÇÃO DE DNA EXTRAÍDOFAGO λ

Para preparar um volume de 500 µL a partir do estoque (500 ng/µL)

- Para 5 ng/µL

$500 \text{ ng/}\mu\text{L} \cdot x = 5 \text{ ng/}\mu\text{L} \cdot 500 \mu\text{L}$

$x = 5 \mu\text{L}$ de fago λ + 495 µL de água ultra pura autoclavada

- Para 20 ng/µL

$500 \text{ ng/}\mu\text{L} \cdot x = 20 \text{ ng/}\mu\text{L} \cdot 750 \mu\text{L}$

$x = 30 \mu\text{L}$ de fago λ + 720 µL de água ultra pura autoclavada

- Para 10 ng/μL a partir da solução de 20 ng/μL

$$20 \text{ ng}/\mu\text{L} \cdot x = 10 \text{ ng}/\mu\text{L} \cdot 500 \mu\text{L}$$

$x = 250 \mu\text{L}$ de fago λ + 250 μL de água ultra pura autoclavada

3) PREPARO DE CORANTE UTILIZADO NAS CORRIDAS ELETROFORÉTICAS

AZUL DE BROMOFENOL (LOAD)

SOLUÇÃO AZUL 20X

	Conc. Final	Sol. Est.	12,5 mL	25 mL	50 mL
Tris base (pH 7,6 a 8,0)	200 mM	2M	1,25 mL	2,5 mL	5 mL
EDTA (pH 8,0 – 0,4 M)	200 mM	0,4M	6,25 mL	12,5mL	25 mL
SDS	2%	10%	2,5 mL	5 mL	10 mL
Azul de Bromofenol	0,4%		0,05 g	0,1 g	0,2 g
Água destilada			2,5 mL	5 mL	10 mL
Total			12,5 mL	25 mL	50 mL

SACAROSE 50%

342,3 g 1000 mL de água destilada 100%

X g 1000 mL de água destilada 50%

X = 171,15 g de sacarose

Para 50 mL de água destilada pesar 8,55 g de sacarose

GEL LOADING SOLUTION (PROPRIAMENTE DITO) → 3:1

Para um total de 50 mL

- 37,5 mL de sacarose 50%
- 12,5 mL do azul de bromofenol (20X)

Tris base 2 M

121,14 g de Tris base 1 M 1000 mL de água ultra pura

X g 2 M 1000 mL de água ultra pura

X= 242,28 g em 1000 mL de água ultra pura

Para 50 mL de água ultra pura pesar 12,114 g de Tris base.

Acertar o pH conforme o indicado com HCl e após completar o volume com água destilada ou miliQ.

EDTA 0,4 M – pH 8,0

372,2 g 1 M 1000 mL

X g 0,4 M 1000 mL

X= 148,88 g em 1000 mL de H₂O ultra pura

Para 100 mL pesar 14,88 g de EDTA

4) PREPARO DO TAMPÃO PARA CORRIDA ELETROFORÉTICAa) TAMPÃO TBE 10X

Tris base ----- 108 g

Ácido bórico ----- 55 g

EDTA (0,5 M pH 8,0) – 40 mL

Completar o volume para 1 L com água destilada ou miliQ . Não acertar o pH. No final o pH deve estar em torno de 8,3.

b) TAMPÃO TBE 5X

Tris base ----- 54 g

Ácido bórico ----- 27,5 g

EDTA (0,5 M pH 8,0) – 20 mL

Completar o volume para 1 L com água destilada ou miliQ . Não acertar o pH. No final o pH deve estar em torno de 8,3.

É indicado o preparo de tampão TBE 5X. O tampão TBE10X geralmente forma um precipitado quando não é utilizado rapidamente.

c) TAMPÃO TBE 1X - DE USO PARA A CORRIDA E PREPARO DO GEL

A partir da solução 10X: $10X \cdot x = 1X \cdot 1000 \text{ mL}$

$x = 100 \text{ mL de tampão 10X} + 900 \text{ mL de água destilada}$

A partir da solução 5X: $5X \cdot x = 1X \cdot 1000 \text{ mL}$

$x = 200 \text{ mL de tampão 5X} + 900 \text{ mL de água destilada}$

5) PREPARO DO GEL PARA CORRIDA ELETROFORÉTICA

a) Gel 0,8% para quantificação de DNA extraído

0,8 g de agarose para cada 100 mL de tampão TBE 1X. A concentração do tampão utilizado para diluição da agarose deve ser de preferência a mesma da corrida.

b) Gel 1,4% para verificação de produto de PCR (RAPD)

1,4g de agarose para cada 100 mL de tampão TBE 1X. A concentração do tampão utilizado para diluição da agarose deve ser de preferência a mesma da corrida.

6) DILUIÇÕES DO PRIMER

a) CONCENTRAÇÃO DE ESTOQUE DO PRIMER (Operon Technologies – Alameda, CA, USA)

O *primer* é diluído para uma concentração estoque de 60 nmol. Esta diluição depende da concentração fornecida na embalagem.

Ex: *primer* OPX18 (31nmol) → este valor vem mencionado no frasco.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$31 \text{ nmol} \cdot 1000 \mu\text{L} = 60 \text{ nmol} \cdot V_2$$

$V_2 = 516,66 \mu\text{L}$ de água mili Q autoclavada \rightarrow concentração final será de $60 \mu\text{M}$.

b) CONCENTRAÇÃO DE USO DO PRIMER (Operon Technologies – Alameda, CA, USA)

Para a reação de RAPD recomenda-se que o *primer* seja diluído para uma concentração de uso de $4 \mu\text{M}$.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$60 \mu\text{M} \cdot V_1 = 4 \mu\text{M} \cdot 225 \mu\text{L}$$

$V_1 = 15 \mu\text{L}$ do *primer* + $210 \mu\text{L}$ de água mili Q autoclavada dando um volume final de $225 \mu\text{L}$.

7) CONCENTRAÇÃO FINAL DOS REAGENTES NA PCR PARA UM VOLUME DE $13 \mu\text{L}$

PRIMER (Concentração de uso = $4 \mu\text{M}$)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$4 \mu\text{M} \cdot 1,5 \mu\text{L} = C_2 \cdot 13 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0,46 \mu\text{M}$$

dNTP mix (Concentração inicial: 10 mM)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$10 \text{ mM} \cdot 0,26 \mu\text{L} = C_2 \cdot 13 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0,2 \text{ mM ou } 200 \mu\text{M}$$

MgCl₂ (INVITROGEN) (Concentração inicial: 50 mM)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$50 \text{ mM} \cdot 0,52 \mu\text{L} = C_2 \cdot 13 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 2 \text{ mM}$$

Taq DNA Polimerase (INVITROGEN) (5 U/ μ L)

5 U/ μ L . 0,2 μ L =1 U

TAMPÃO PCR 10X (INVITROGEN)

TrisHCl pH 8,0 (Concentração inicial 200 mM)

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

200 mM. 1,3 μ L = C_2 . 13 μ L

$C_2 = 20$ mM

KCl (Concentração inicial 500 mM)

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

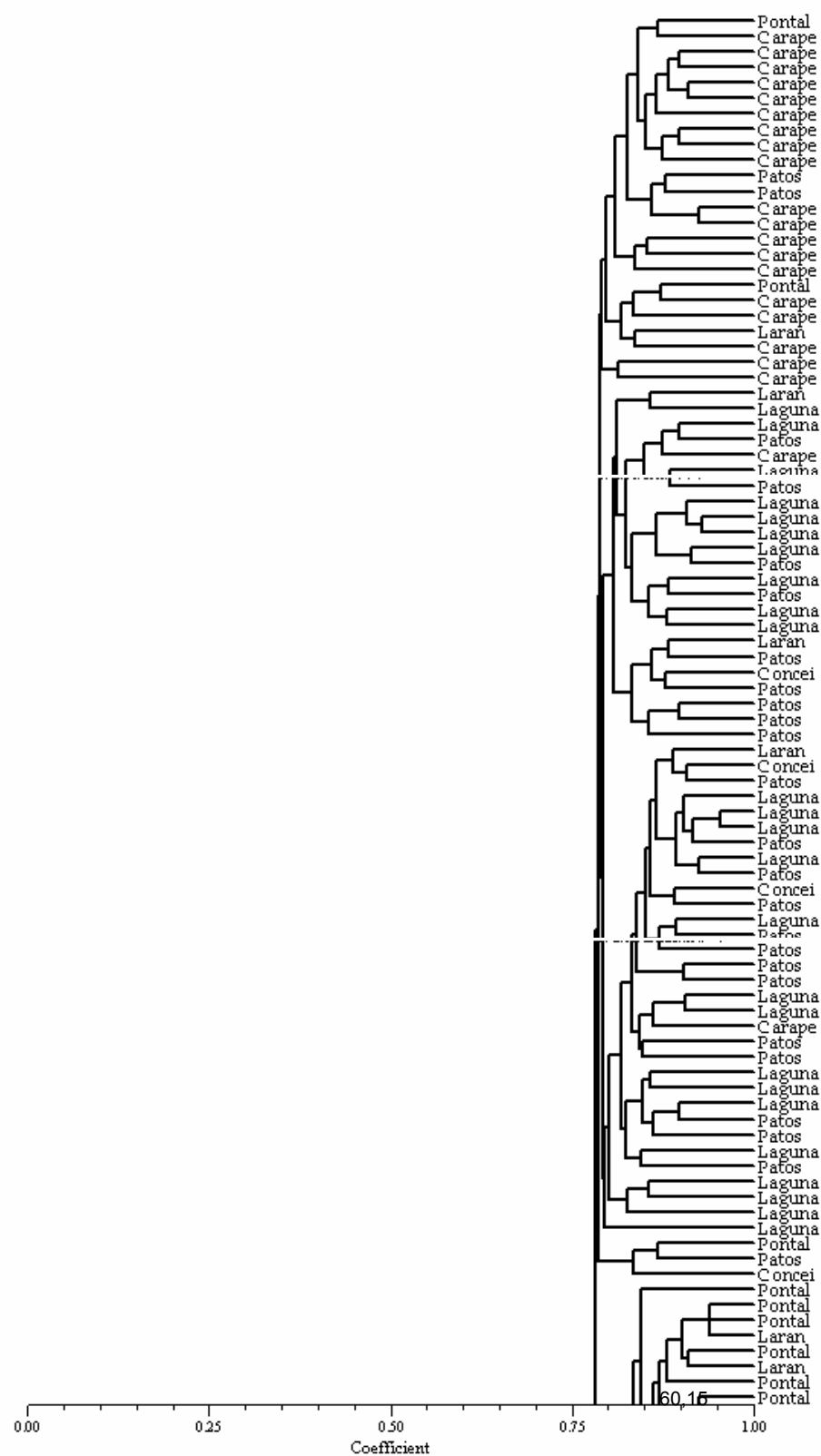
500 mM. 1,3 μ L = C_2 . 13 μ L

$C_2 = 50$ mM

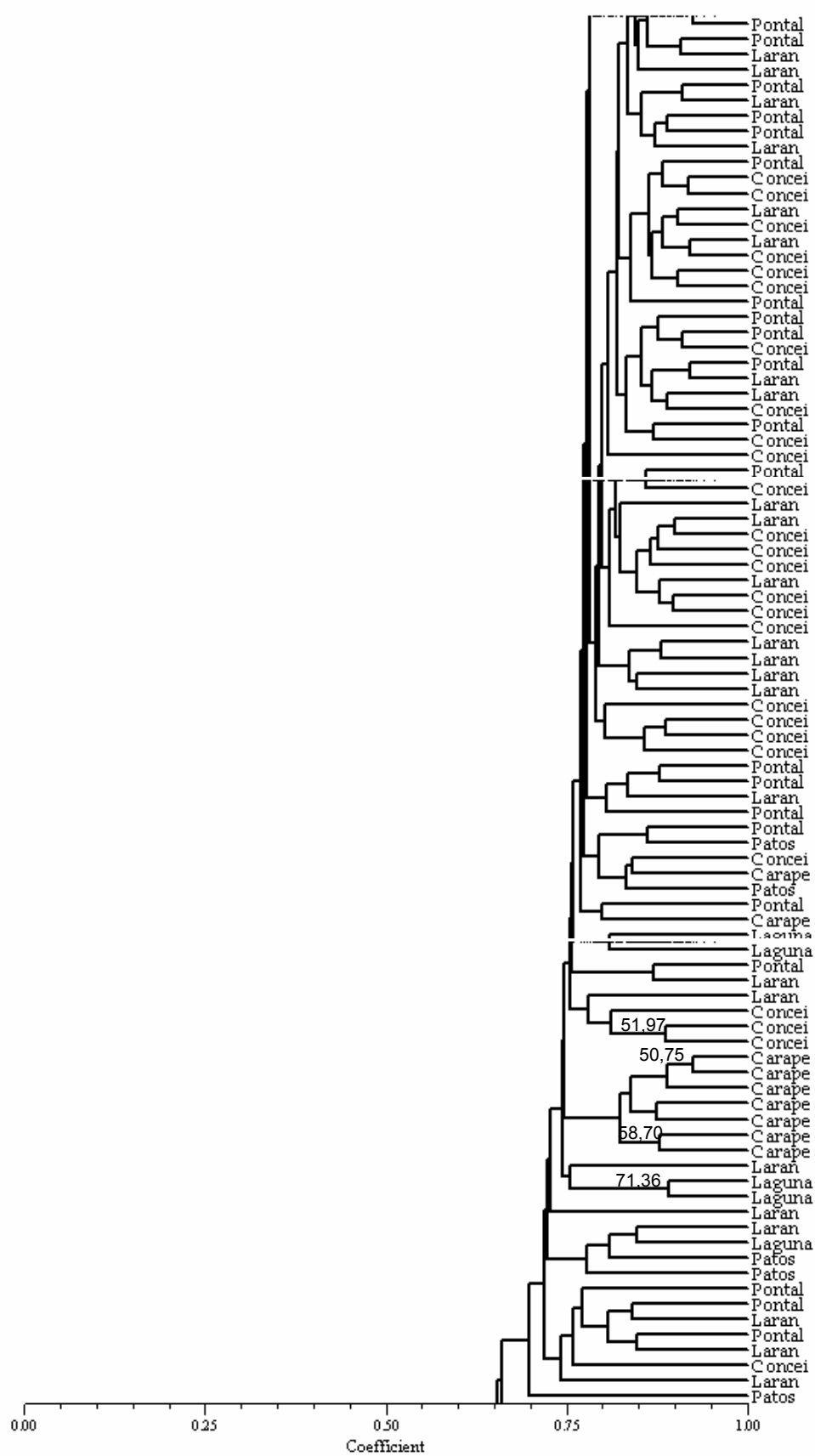
APÊNDICE 2 - DENDROGRAMA

DENDROGRAMA BASEADO NO COEFICIENTE DE JACCARD (1901) E MÉTODO UPGMA PARA *Atherinella brasiliensis* e *Odontesthes argentinensis*

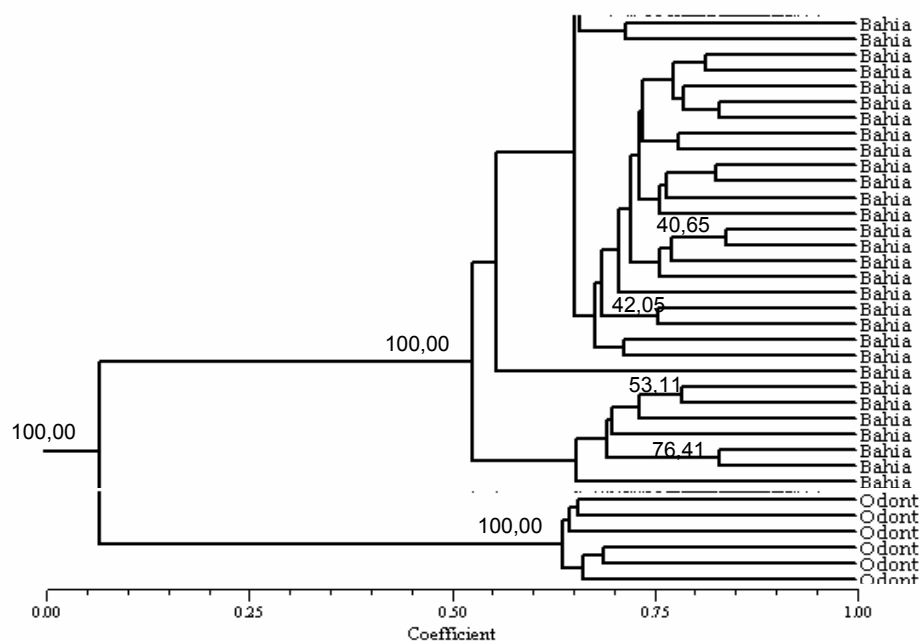
(continua)



(continuação)



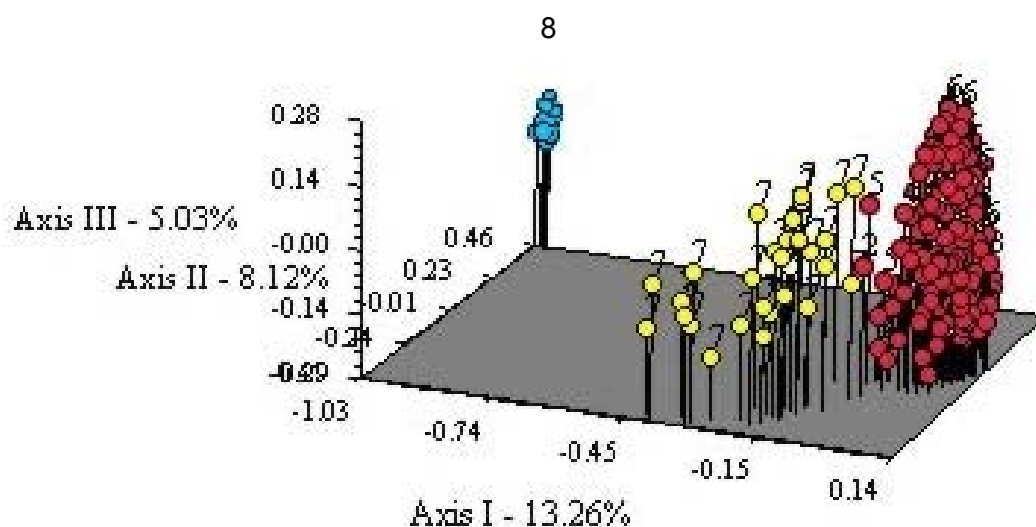
(conclusão)



NOTA: Pontal: Pontal do Sul (PR), Laran: Laranjeiras (PR), Concei: Lagoa da Conceição (SC), Patos: Lagoa dos Patos (SC), Laguna: Lagoa do Camacho (SC), Carape: Lagoa de Carapebus (RJ), Bahia: Barra Grande de Camamu (BA), Odont: Odontesthes argentinensis (grupo externo)

APÊNDICE 3 – GRÁFICOS DE COORDENADAS PRINCIPAIS TRIDIMENSIONAIS

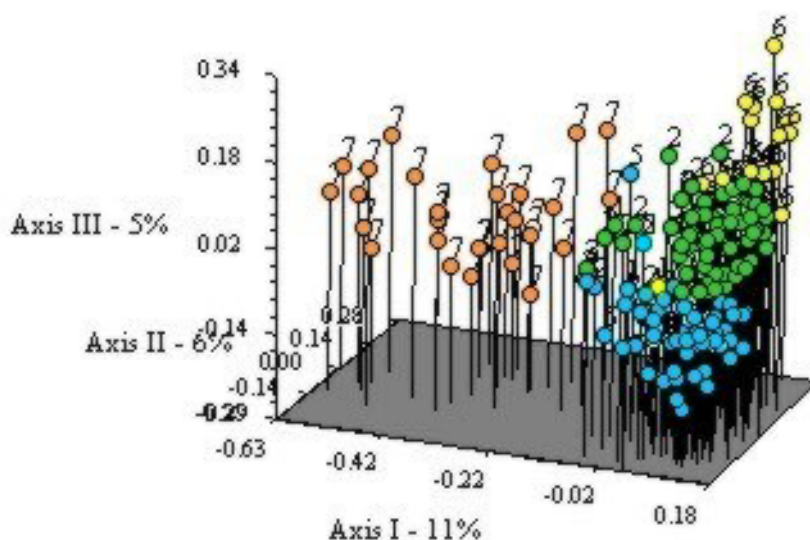
GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS TRIDIMENSIONAL OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA AS ESPÉCIES *Atherinella brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS E *Odontesthes argentinensis* (GRUPO EXTERNO)



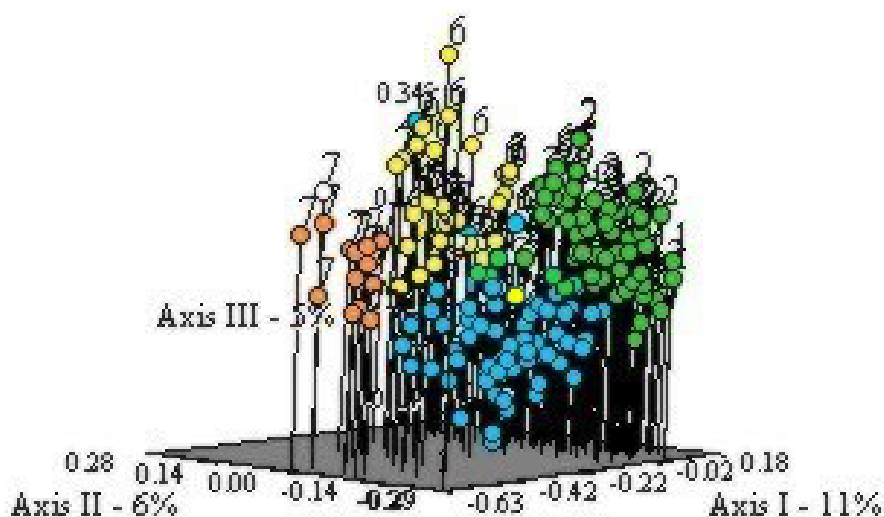
NOTA: O número 8 (azul) representa os exemplares *Odontesthes argentinensis* (grupo externo), o número 7 (amarelo) representa os exemplares de *Atherinella brasiliensis* da localidade de Barra Grande de Camamu (BA) e os números de 6 a 1 (vermelho) representam os exemplares de *Atherinella brasiliensis* das demais localidades estudadas

GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS TRIDIMENSIONAL OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA A ESPÉCIE *Atherinella- brasiliensis* DAS SETE LOCALIDADES ANALISADAS

a)



b)

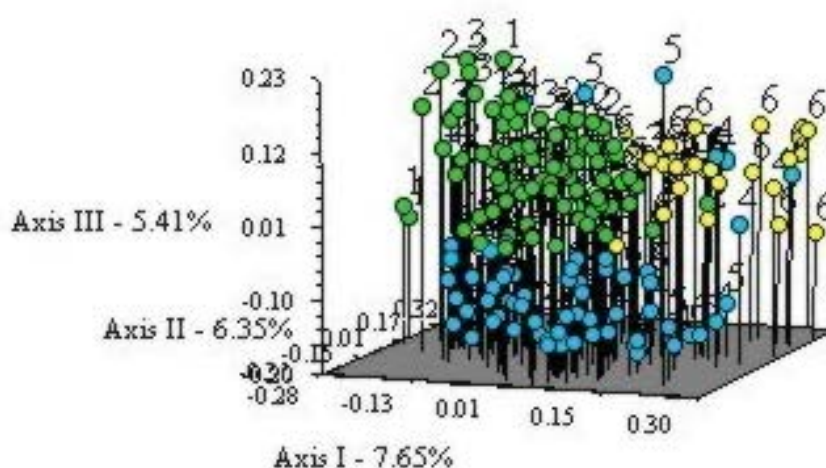


NOTA: a) O número 7 (laranja) representa os exemplares da localidade de Barra Grande de Camamu (BA), o número 6 (amarelo) representa os da Lagoa de Carapebus (RJ), os números 5 e 4 (azul) os de Lagoa dos Patos (RS) e Lagoa do Camacho (SC), os números 3, 2 e 1 (verde) os da Lagoa da Conceição (SC), Laranjeiras (PR) e Pontal do Sul (PR)

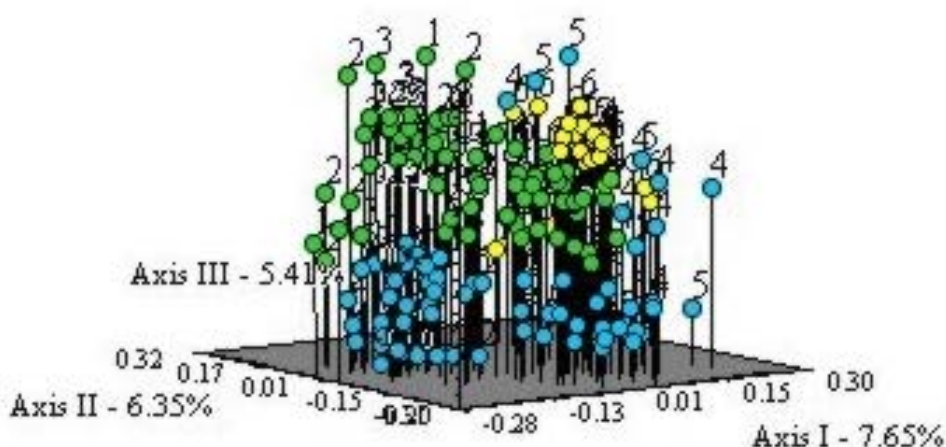
b) Idem ao item a visualizado sob um ângulo diferente

GRÁFICO DE COORDENADAS PRINCIPAIS TRIDIMENSIONAL OBTIDO A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD (1901) PARA A ESPÉCIE *Atherinella brasiliensis* DAS LOCALIDADES DE PONTAL DO SUL E LARANJEIRAS (PR), LAGOA DA CONCEIÇÃO E LAGOA DO CAMACHO (SC), LAGOA DOS PATOS (RS) E LAGOA DE CARAPEBUS (RJ)

a)



b)



NOTA: a) O número 6 (amarelo) representa os exemplares da Lagoa de Carapebus (RJ), os número 5 e 4 (azul) os de Lagoa dos Patos (RS) e Lagoa do Camacho (SC), os números 3, 2 e 1 (verde) os da Lagoa da Conceição (SC), Laranjeiras (PR) e Pontal do Sul (PR)

b) Idem ao item a visualizado sob um ângulo diferente